

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FÁRMACIA



Importância da apoptose nas neoplasias hematopoiéticas.
Metodologias usadas e novos fármacos.

Ana Paula Silvério da Silva

Monografia orientada pela Prof.^a Doutora Leonor Correia

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

LISBOA, 2014

Índice

Abstrat	I
Resumo	II
Abreviaturas.....	III
Índice de tabelas	VIII
Índice de figuras	IX
1. Apoptose.....	1
1.1. Definição	1
1.2. Mecanismos	2
1.2.1. Via intrínseca.....	3
1.2.2. Via extrínseca	6
1.2.3. Via perforina/granzimas A e B.....	8
1.3. Metodologias usadas	9
1.3.1. Microscopia de fluorescência - Coloração de Hoechst e com iodeto de propídio	9
1.3.2. Imuno-histoquímica - <i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling</i>	10
1.3.3. Citometria de fluxo - Anexina V/Isotiocianato de fluoresceína.....	11
1.3.4. <i>Microarrays</i> de DNA	13
2. Neoplasias hematopoiéticas.....	15
2.1. Definição	15
2.2. Classificações	16
2.2.1. Classificação <i>French-American-British</i>	16
2.2.2. Classificação da Organização Mundial de Saúde (2008)	17
2.2.2.1.Princípios.....	18
2.2.2.2.Critérios	18
3. Farmacoterapia das neoplasias hematopoiéticas: alvos moleculares	27
3.1. Anti-apoptóticos	29
3.1.1. Via Intrínseca.....	29
3.1.1.1.Família dos inibidores das proteínas da apoptose	29
3.1.1.2.Família <i>B-cell lymphoma 2</i>	30
3.1.2. Via Extrínseca.....	35
3.1.2.1. <i>FADD-like interleukin-1β-converting enzyme (FLICE)-inhibitory</i>	35
3.2. Pró-apoptóticos.....	36

3.2.1. Via Intrínseca.....	36
3.2.1.1.Família <i>B-cell lymphoma 2</i>	36
3.2.2. Via Extrínseca.....	39
3.2.2.1Fator de necrose tumoral alfa	39
3.2.2.2Ligando do Fas	40
3.2.2.3 <i>Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>	41
3.3. Outros alvos regulatórios da apoptose.....	44
3.3.1.Chaperones moleculares	44
3.3.2.Via fosfatidil-inositol 3-cinase/ proteína cinase B	46
3.3.3.Cascata janus cinase/transdutores de sinais e ativadores de transcrição	49
3.3.4.Recetores tirosina cinase.	52
3.3.5.Proteína cinase C	54
3.3.6.Fator nuclear kappa B.....	55
3.4. Outros fármacos indiretamente implicados	56
3.4.1.Inibidores do proteossoma.....	56
3.4.2.Inibidores das cinases dependentes de ciclinas	57
3.4.3.Inibidores da desacetilação das histonas	58
4. Discussão	61
5. Conclusões e perspectivas futuras	67
6. Bibliografia.....	69

Abstrat

Apoptosis, also called programmed cell death, is a physiological process that causes a series of morphological and biochemical changes that occur in the cell, and that leads to his death. Apoptosis is responsible for controlling the quantity and different types of cells, removing those that are harmful to the body.

A variety of molecules regulating apoptosis was identified and plays an important role in regulating cell death in hematopoietic neoplasms. These molecules, targets of both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways, are relevant to the development of therapeutics.

The study of anti-apoptotic targets of the intrinsic pathway suggests a promising therapeutic potential for a new class of anticancer drugs based on small molecule inhibitors. The pro-apoptotic targets of the extrinsic pathway that are being used include the death receptors of the tumor necrosis factor family. Other regulatory targets of apoptosis addressed to cell survival pathways including the tyrosine kinase pathway. Several classes of drugs are already used in clinical practice, others are still in clinical trials.

There have been many efforts, over the last years, for combination of drugs development to overcome the resistance mechanisms. Epigenetic strategies based on histone deacetylation inhibitors have proved to be well tolerated alternatives.

The classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissue, 2008, the World Health Organization, brought new paradigm and new criteria, particularly through the introduction of genetic information in the diagnosis of hematopoietic neoplasms.

The treatment of hematopoietic neoplasms increasingly customized by the diagnostic specificity as well as by increasing the number of possible combinations of drugs may increase the efficacy and reduce drug toxicity. These factors contribute to an increased length and quality of life of patients.

Resumo

A apoptose, também denominada morte celular programada, é um processo fisiológico que provoca uma série de alterações morfológicas e bioquímicas que ocorrem na célula e que conduzem à sua morte. É responsável por controlar a quantidade e os diferentes tipos de células, removendo as que são prejudiciais para o organismo.

Foi identificada uma grande variedade de moléculas reguladoras da apoptose que desempenham um papel importante na regulação da morte celular, em neoplasias hematopoiéticas. Essas moléculas, alvos de ambas as vias apoptóticas, intrínseca e extrínseca, são relevantes para o desenvolvimento da terapêutica.

O estudo dos alvos anti-apoptóticos da via intrínseca sugere o potencial terapêutico promissor de uma nova classe de fármacos anticancerígenos baseado em pequenas moléculas inibidoras. Os alvos pró-apoptóticos da via extrínseca que estão a ser usados incluem os recetores de morte da família do fator de necrose tumoral. Outros alvos regulatórios da apoptose dirigem-se a vias de sobrevivência das células nomeadamente a via da tirosina cinase. Várias classes de fármacos já são usados na prática clínica outros encontram-se, ainda, em ensaios clínicos.

Tem havido muitos esforços, ao longo dos últimos anos, para o desenvolvimento de regimes de combinação de fármacos com o objetivo de ultrapassar os mecanismos de resistência. As estratégias epigenéticas, baseadas nos inibidores da desacetilação das histonas, mostraram ser alternativas bem toleradas.

A classificação dos tumores do tecido hematopoiético e linfático, de 2008, da Organização Mundial de Saúde, trouxe novo paradigma e novos critérios, sobretudo através da introdução da informação genética no diagnóstico das neoplasias hematopoiéticas.

A terapêutica das neoplasias hematopoiéticas, cada vez mais personalizada pela especificidade do diagnóstico, bem como pelo aumento do número de possíveis combinações de fármacos, pode aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade farmacológica. Tais fatores contribuem para um aumento do tempo e da qualidade de vida dos doentes.

Abreviaturas

ADD70 – *AIF derived decoy for HSP70*

ADP – Adenosina difosfato

AIF – “Fator indutor de apoptose”

AKT – *Protein kinase B (PKB)*

Apaf-1 – *Apoptotic protease activating factor-1*

ATP – Adenosina trifosfato

ATRA – “Ácido retinóico all-trans”

Bad – *Bcl-2-associated death promoter*

Bak – *Bcl-2 homologous antagonist killer*

Bax – *Bcl-2-associated X protein*

Bcl-2 – *B-cell lymphoma 2*

Bcl-w – *Bcl-2 like 2*

Bcl-xL – *Bcl-2 extra large*

Bcr-Abl – *Breakpoint Cluster Region / Abelson Leukemia Virus*

BH – *Bcl-2 homology*

BH3 – *Bcl-2 homology region 3*

Bid – *BH3 interacting domain death agonist*

Bim – *Bcl-2-interacting mediator of cell death*

CD95 – *Cluster of differentiation 95*

CDC – Cinases dependentes de ciclinas

CEH – Células estaminais hematopoiéticas

c-FLIP – *FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme (FLICE)-inhibitory*

DAG – Diacilglicerol

DcR – *Death decoy receptor*

DISC – *Death-inducing signaling complex*

DLPT – Doenças linfoproliferativas pós-transplante

DNA – “Ácido desoxirribonucleico”

DR – “Recetor de morte”

EBNA – *Epstein-Barr virus nuclear-antigen*

EBV – “Vírus de Epstein-Barr”

EHA – “Associação Europeia de Hematologia”

ERK – *Extracellular signal-regulated kinase*

FAB - *French-American-British*

FADD – *Fas adaptor death domain*

FasL – Ligando do Fas

FDA – *Food and Drug Administration*

FITC – “Isotiocianato de fluoresceína”

FLICE – *FADD-like interleukin-1-beta converting enzyme*

FLT3 – *FMS-like tyrosine kinase 3*

FLT-3-ITD – *FMS-like tyrosin-kinase-3- internal tandem duplication*

FMS – “Linhagem Susan McDonough do vírus do sarcoma felino”

FNT - Fator de necrose tumoral

GA – “Ansamicina geldanamicina”

HDACi – “Inibidores da desacetilação das histonas”

HSP – “Proteína de choque térmico”

HSPI – “Inibidores de proteínas de choque térmico”

HTLV – “Vírus T-linfotrópico humano”

HTRA2 – High temperature requirement protein A2

IAP – “Inibidores de proteínas da apoptose”

ICDC – Inibidor das cinases dependentes de ciclinas

I-kappaB – *Inhibitor of NF-kappaB*

IKK – *I-kappaB kinase*

INF- γ – Interferão-gama

ITC - Inibidores de tirosina-cinase

JAK – “Janus cinase”

JNK – “Cinase de c-Jun N-terminais”

LDGCB - Linfoma difuso de grandes células B

LEC - Leucemia eosinofílica crónica

LLA - Leucemia linfoblástica aguda

LLC - Leucemia linfocítica crónica

LMA- Leucemia mielóide aguda

LMC – Leucemia mielóide crónica

LMMC – Leucemia mielomonocítica crónica

LNC - Leucemia neutrofílica crónica

LNH – Linfoma não-Hodgkin

LPA - Leucemia promielocítica aguda

LTC – Linfócitos T citotóxicos

MAPK – *Mitogen activated protein kinase*

Mcl-1 – *Myeloid cell leukemia 1*

MEK – *Mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase*

MF – Mielofibrose

MFP - Mielofibrose primária

MM – Mieloma múltiplo

MOMP – “Permeabilização da membrana externa mitocondrial”

MS - Mastocitose sistêmica

mTOR – “Alvo da rapamicina em mamíferos”

mTORC – “Complexo mTOR”

NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleótido

N-BP – “Bisfosfonatos aminados”

NF-kB – “Fator nuclear kappa B”

NK – Células “natural killer”

NMD - Neoplasias mielodisplásicas

NMP – Neoplasias mieloproliferativas

NOS – *Not otherwise specified*

NPM/ALK – *Nucleophosmin/Anaplastic lymphoma kinase*

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPG - Osteoprotegerina

PARP – *Poly (ADP-ribose) polymerase*

PDGFR – *Platelet-derived growth factor receptor*

Ph – “Filadélfia”

PI3K – “Fosfatidil-inositol 3-cinase”

PKB – “Proteína cinase B”

PKC – “Proteína cinase C”

PMI - Pequenas moléculas inibidoras

PTEN – *Phosphatase and tensin homolog*

PUMA - *p53-upregulated modulator of apoptosis*

PV - Policitemia vera

RFNT – Recetor FNT-alfa

RTC – Recetores tirosina-cinase

SAHB – *Stabilized alpha-helix of BCL-2 domains*

SMAC - *Second mitochondria-derived activator of caspases*

STAT – “Transdutor do sinal e ativador de transcrição”

TC – Tirosina-cinase

TdT – “Desoxinucleotidil transferase terminal”

TE - Trombocitemia essencial

TRADD – *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein*

TRAIL - *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*

TUNEL - *TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling*

VEGF – *Vascular endothelial growth factor*

WT – *Wild type*

Índice de tabelas

Tabela 1 – Proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas da família Bcl-2.	5
Tabela 2 - Classificação dos tumores do tecido hematopoiético e linfóide (Organização Mundial de Saúde 2008).....	21
Tabela 3–Propriedades de membros anti-apoptóticos da família Bcl-2.....	30
Tabela 4 – Membros da família Bcl-2 em diferentes tipos de leucemias.....	31
Tabela 5 – Ensaios clínicos de fase II e III com Oblimersen sódico.....	32
Tabela 6 – Agentes alvo das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2.....	32
Tabela 7 - Propriedades de membros pró-apoptóticos da família Bcl-2.	36
Tabela 8 – Inibidores HSP90 em ensaios clínicos.....	45

Índice de figuras

Figura 1 – Vias extrínseca e intrínseca da apoptose	2
Figura 2 – Via mitocondrial da apoptose.	4
Figura 3 – Via extrínseca da apoptose.....	6
Figura 4 – Vias de ativação da apoptose em linfócitos T citotóxicos.	8
Figura 5 - Coloração de TUNEL em células tumorais de ratinho cultivadas.....	10
Figura 6 – Análise da apoptose por citometria de fluxo com iodeto de propídio.....	12
Figura 7 – <i>Microarrays</i> de DNA	13
Figura 8 – Regulação da apoptose e interações moleculares entre as vias apoptóticas..	27
Figura 9 – Estratégias farmacológicas com um composto mimético BH3 para reativar a morte celular em neoplasias hematológicas refratárias.	33
Figura 10 – Terapia farmacológica para reativar a morte celular, em neoplasias hematológicas refratárias, com um péptido estabilizado BIM BH3.....	37
Figura 11 – Fármacos pró-apoptóticos agonistas de TRAIL-R1 e TRAIL-R2.	43

1. Apoptose

1.1. Definição

A apoptose, também denominada morte celular programada, é um processo fisiológico que provoca uma série de alterações morfológicas e bioquímicas que ocorrem na célula e que conduzem à sua morte. Juntamente com os processos de proliferação, diferenciação e maturação, é responsável por controlar a quantidade e os tipos de células produzidas, removendo as que são desnecessárias ou perigosas para o organismo (1).

A apoptose desempenha um papel relevante na homeostase de diferentes tecidos, tais como o hematopoiético. Este processo é de crucial importância para o desenvolvimento embrionário, maturação do sistema imunitário, defesa contra infecções virais e eliminação de tumores. A apoptose ocorre tanto no desenvolvimento embrionário e na renovação tecidular, como na resposta patológica à lesão celular por alterações do ácido desoxirribonucleico (*DNA*), devida a infecções por patógenos, ou outras situações que representem ameaças à integridade do organismo (2, 3).

A apoptose é a contraposição à mitose para a regulação da homeostase. O crescimento de um tecido, normal ou maligno, é resultante do equilíbrio entre as taxas de proliferação e de destruição celulares, resultantes de um equilíbrio entre reguladores de vias pró e anti-apoptóticas, que controlam o processo e mantêm a homeostase (3).

Se inapropriadamente regulada, a apoptose pode contribuir para várias doenças, tais como as autoimunes e as neoplásicas (4).

A apoptose é regulada por inúmeros fatores inibidores e ativadores. Entre os inibidores estão algumas proteínas da família de *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) e da família de inibidores das proteínas da apoptose (IAP). Entre os ativadores estão o Fas ou *cluster of differentiation 95* (CD95), os receptores de morte 4 (DR4) e 5 (DR5), o interferão-gama (INF- γ) e outras proteínas membros da família Bcl-2. O sistema Fas-FasL é constituído pelo recetor Fas e o seu ligando (FasL), ambos membros da família do fator de necrose tumoral (FNT) (2).

1.2. Mecanismos

Estão bem identificadas duas vias apoptóticas clássicas principais, a via extrínseca, desencadeada pela agregação de "recetores de morte" e a via intrínseca, ou mitocondrial, que responde a sinais de stresse, tais como as radiações, provocando a libertação de sinais intracelulares que promovem a morte celular (Fig.1) (4).

As enzimas mais importantes, envolvidas na apoptose, são as caspases, que hidrolisam as proteínas estruturais e funcionais conduzindo à morte celular. As caspases são sintetizadas na célula como zimogénios inativos, que têm que ser ativados, para desempenharem as suas funções (1).

A apoptose pode ser desencadeada por estímulos externos, devidos à interação dos recetores de membrana com os seus ligandos ou pelo stresse intracelular. Esta última via é dependente das mitocôndrias. Ambas as vias culminam com a ativação de proteases conhecidas como caspases executoras (2).

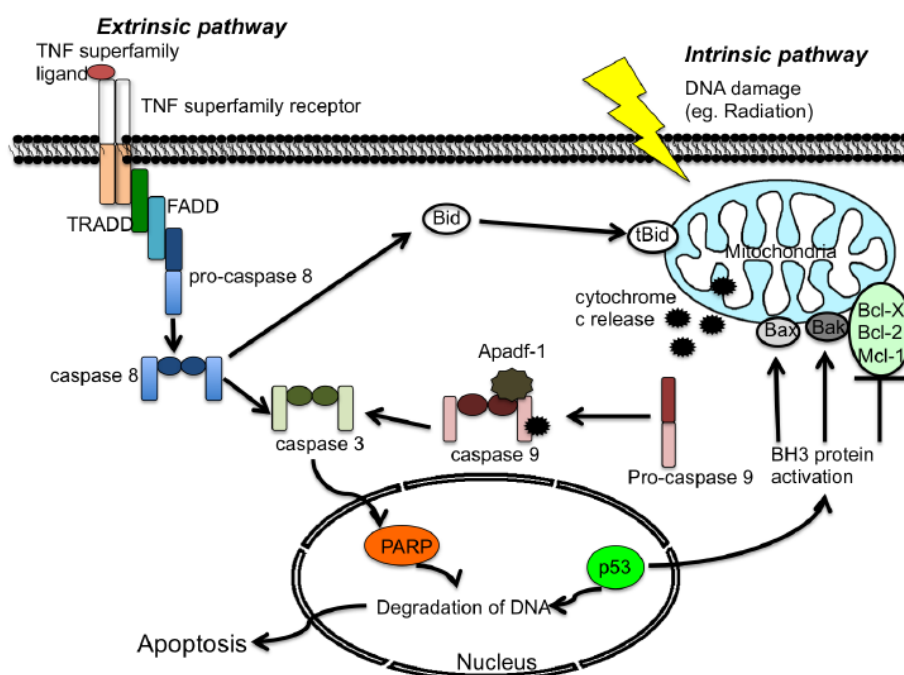


Figura 1 - Vias extrínseca e intrínseca da apoptose. Apaf-1, Apoptotic protease activating factor-1; Bak, Bcl-2 homologous antagonist killer; Bax, Bcl-2-associated X protein; Bcl-2, B-cell lymphoma 2; Bcl-xL, Bcl-2 lymphoma extra large; BH3, Bcl-2 homology region 3; BID, BH3 interacting domain death agonist; FADD, Fas adaptor death domain; Mcl-1, Myeloid cell leukemia 1; PARP, Poly (ADP-ribose) polymerase; TNF, tumor necrosis factor; TRADD, Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein (Retirado de Yuan et al, 2012).

1.2.1. Via intrínseca

A via apoptótica intrínseca clássica, também referida como via mitocondrial, pode responder a vários estímulos externos, tais como alterações no *DNA*, radiações e stresse osmótico. A ativação desta via resulta na libertação do citocromo c do espaço intermembranar mitocondrial para o citosol. O *apoptotic protease activating factor-1* (Apaf-1), a pró-caspase 9 e o citocromo c vão, em seguida, formar um complexo no citosol, denominado apoptossoma. A ligação do Apaf-1 e do citocromo c à prócaspase-9, leva à sua auto-clivagem. A caspase-9 ativa cliva e ativa a caspase-3 que, por sua vez, induz a clivagem de substratos adicionais, tais como a *Poly (ADP-ribose) polymerase* (PARP), e proteína cinase C-delta. A PARP é uma enzima nuclear que catalisa a transferência da porção adenina difosfato (ADP)-ribose do nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) para um subconjunto específico de substratos nucleares, em resposta às alterações do *DNA* (4).

O elemento central da via mitocondrial é o apoptossoma, um complexo de proteínas que permite e facilita a ativação da pró-caspase 9, do Apaf-1, do citocromo c e de adenosina trifosfato (ATP), que são necessários para formar o apoptossoma. Apoptossomas ativos surgem, apenas, em resposta a agentes apoptóticos. Existem muitos fatores que regulam a formação do apoptossoma em condições fisiológicas. Os distúrbios na formação do apoptossoma têm grande importância na patogénese do cancro e na ocorrência de resistência à quimioterapia (1).

Bcl-2 e a Via Intrínseca da Apoptose

A demonstração de que o gene Bcl-2 bloqueia a apoptose foi, por assim dizer, o marco inicial para os estudos da relação entre apoptose e cancro, ainda que o sistema apoptótico não tenha sido desenvolvido evolutivamente para preveni-lo. Em alguns linfomas e leucemias linfocíticas crónicas (LLC) de células B, entre outras neoplasias, há aumento da expressão da proteína Bcl-2, com consequente efeito anti-apoptótico (3).

Ao nível molecular, a apoptose é levada a cabo pelo apoptossoma. Na via intrínseca (Fig.2), as células são induzidas a sofrer apoptose por alterações do *DNA* e stresse do retículo endoplasmático. A cascata subsequente, regulada pelas proteínas da

família Bcl-2, leva à despolarização mitocondrial, à liberação do citocromo c e à ativação de caspases a jusante (5).

Na família de proteínas Bcl-2, os membros são definidos pela partilha de, pelo menos, um dos quatro domínios de *Bcl-2 homology* (BH). A proteína Bcl-2 controla a via intrínseca da apoptose. Os membros desta família são pró-apoptóticos ou anti-apoptóticos. Os pró-apoptóticos podem ser divididos em grupos com um ou vários domínios. Os multidomínios da família Bcl-2, *Bcl-2 homologous antagonist killer* (Bak) e *Bcl-2-associated X protein* (Bax) podem oligomerizar para formar poros na membrana mitocondrial, e são necessários para a apoptose por meio da via intrínseca (5).

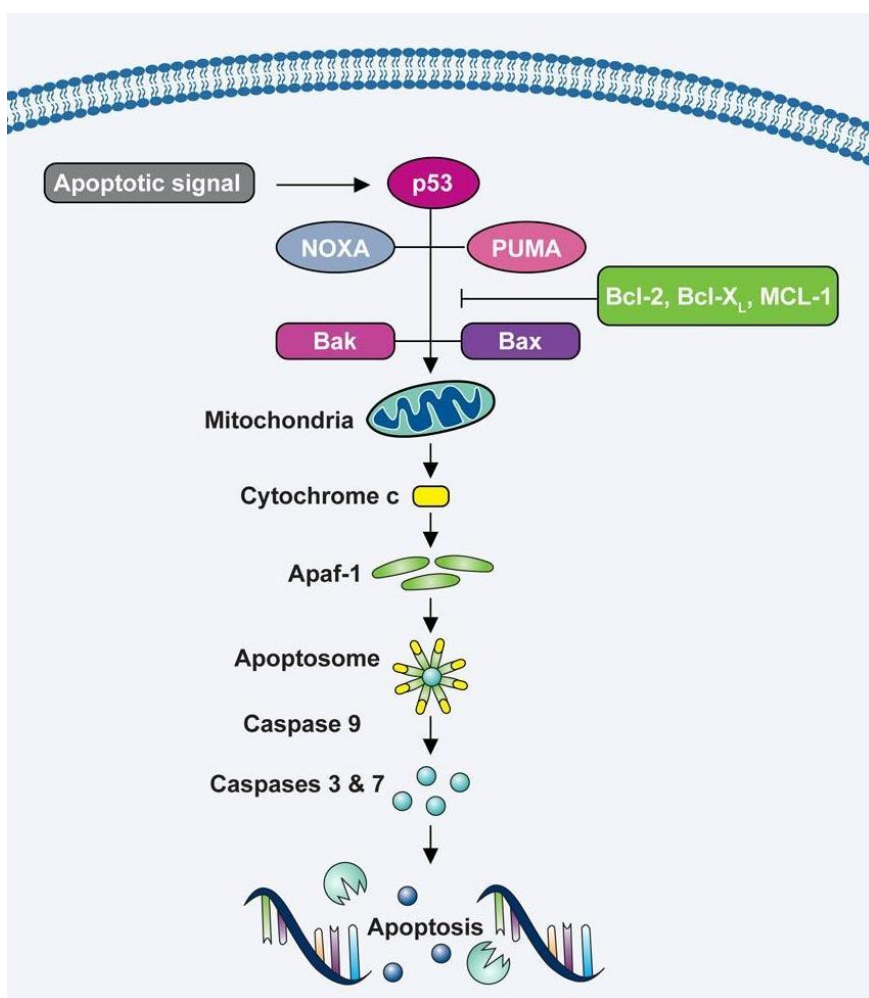


Figura 2 –Via mitocondrial da apoptose. Apaf-1, Apoptotic protease activating factor-1; Bak, Bcl-2 homologous antagonist killer; Bax, Bcl-2-associated X protein; Bcl-2, B-cell lymphoma 2; Bcl-xL, Bcl-2 lymphoma extra large; Mcl-1, Myeloid cell leukemia 1; PUMA, p53-upregulated modulator of apoptosis (Adaptado de <http://www.bioncology.com/research-education/apoptosis/>).

As proteínas *Bcl-2* *homology region 3* (BH3), como *Bcl-2-interacting mediator of cell death* (Bim), *Bcl-2-associated death promoter* (Bad), *BH3 interacting domain death agonist* (Bid), Noxa e *p53-upregulated modulator of apoptosis* (Puma), compartilham apenas um domínio BH com a Bcl-2 e são as iniciadoras da via apoptótica. Elas são capazes de responder a estímulos e também de iniciar a apoptose através de interações com outros membros da família Bcl-2 (5).

As proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 tais como Bcl-2, *Bcl-2 lymphoma extra large* (Bcl-xL), *myeloid cell leukemia 1* (Mcl-1) e *Bcl-2 like 2* (Bcl-w), entre outras, partilham vários domínios BH com Bcl-2 e têm mostrado ligar Bak e/ou Bax e proteínas BH3 (5).

Embora as interações entre as proteínas anti-apoptóticas e as proteínas BH3 e Bak/Bax tenham sido descritas, em diversos sistemas isentos de células, é ainda incerto se estas funções (ligação de proteínas BH3 ou ligação de Bak/Bax) são dominantes *in vivo*. Devido à sua importância na prevenção da apoptose, os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 têm demonstrado ser importantes durante os processos de desenvolvimento (5).

Tabela 1 – Proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas da família Bcl-2. Bak, Bcl-2 homologous antagonist killer; Bax, Bcl-2-associated X protein; Bad, Bcl-2-associated death promoter; Bcl-2, B-cell lymphoma 2; Bcl-xL, Bcl-2 lymphoma extra large; Bcl-w, Bcl-2 like 2; BID, BH3 interacting domain death agonist; Bim, Bcl-2-interacting mediator of cell death; Mcl-1, Myeloid cell leukemia 1; PUMA, p53-upregulated modulator of apoptosis; (Adaptado de <http://www.bioncology.com/research-education/apoptosis/>).

Pro-apoptotic	Anti-apoptotic
Bax	Bcl-2
Bak	Bcl-X _L
BOK	Bcl-W
BIM	MCL-1
BID	Bcl-B
BAD	+ viral homologs
NOXA	
PUMA	

1.2.2. Via extrínseca

A apoptose é desencadeada, através da via extrínseca (Fig.3), quando recetores específicos são ativados pelos seus ligandos. A maioria destes ligandos de “morte” pertence à família FNT (4).

A via extrínseca da apoptose é iniciada pela ligação de um ligando da família FNT ao seu recetor, seguida pela ativação de proteínas de sinalização a jusante. Na via intrínseca, o stress celular provoca a ativação de BH3 e a libertação do citocromo c. Ambas as vias vão ativar a caspase-3 (efetora) e promover a morte celular (4, 5).

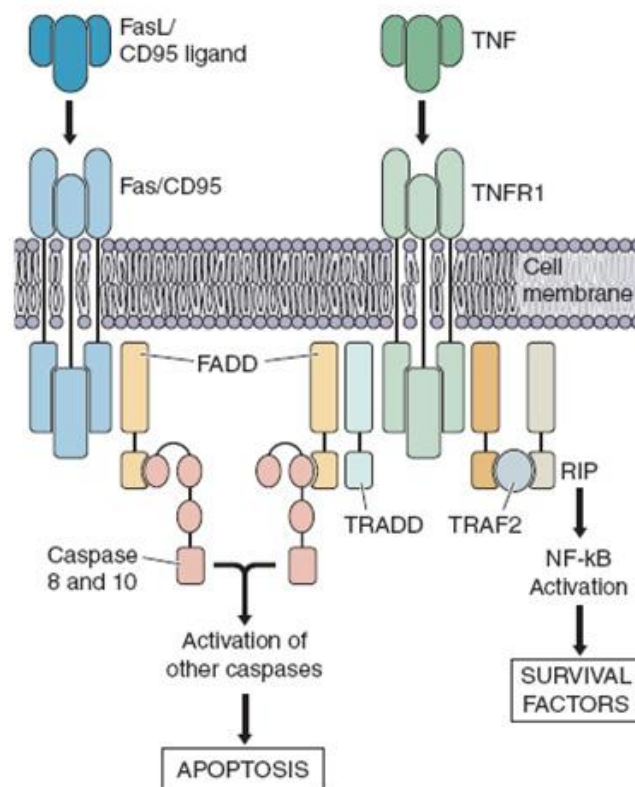


Figura 3 - Via extrínseca da apoptose. FADD, Fas adaptor death domain; Fas, Cd95; FasL, Ligando do Fas; NF-kB, nuclear factor kappa-B; RIP, Receptor-interacting protein; TNF, Tumor necrosis factor; TNFR1, tumor necrosis factor receptor 1; TRADD, Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein; TRAF2, TNF receptor-associated factor 2 (Retirado de Rao et al, 2006).

A via extrínseca da apoptose é o mecanismo pelo qual as células são sinalizadas para morrer. Os fatores que desencadeiam esse percurso são o FNT, o *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), e o FasL. Estas moléculas podem ligar-se a recetores da superfície da célula para desencadear uma cascata apoptótica. Após a ativação dos recetores de morte, domínios da porção intracelular do recetor recrutam o domínio de morte contendo adaptadores, tais como a proteína *Fas adaptor death domain* (FADD) e o *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein* (TRADD). O FADD liga-se à pró-caspase 8 que, em seguida, é submetida a homodimerização e auto-clivagem, para formar a caspase 8 ativa. Em seguida inicia-se a ativação de caspases a jusante, levando a célula à apoptose (5).

1.2.3. Via perforina/granzimas A e B

Para além das duas vias apoptóticas clássicas, intrínsecas e extrínsecas, há pelo menos uma via extrínseca acessória bem definida para desencadear a apoptose, a via perforina/granzimas A e B (Fig.4). As granzimas A e B são enzimas dos linfócitos granulares, serina-proteases, que clivam especificamente os seus substratos. As granzimas são expressas por linfócitos T citotóxicos (LTC) ativados e células *natural killer* (NK). A granzima B liga-se ao seu recetor e está sujeita a endocitose, mas permanece em vesículas até estas serem libertadas pela perforina. O sistema perforina/granzimas A e B faz parte do mecanismo de vigilância imunológica, onde as células cancerígenas e as infetadas por vírus são alvos de células LTC e NK antes da infeção generalizada ou progressão do cancro acontecer (6).

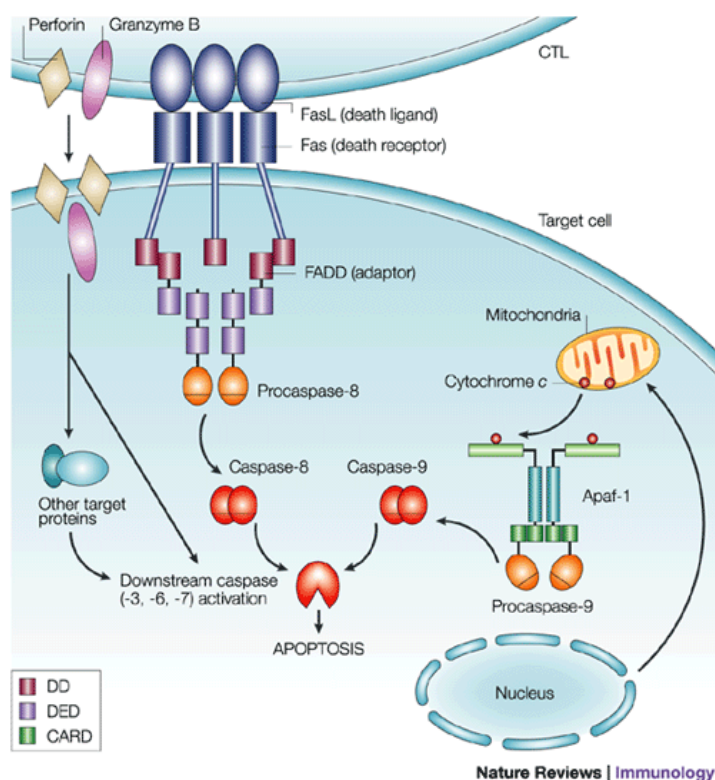


Figura 4- Vias de ativação da apoptose em linfócitos T citotóxicos. Apaf-1, Apoptotic protease activating factor-1; CTL, Linfócito T citotóxico; CARD, Caspase-recruitment domain; DD, Death domains; DED, Death effector domain; FADD, Fas adaptor death domain; Fas, CD95; FasL, Ligando do Fas; (Retirado de Thome et al, 2001).

1.3. Metodologias usadas

1.3.1. Microscopia de fluorescência - Coloração de Hoechst e com iodeto de propídio

Neste método, o processo de coloração é realizado com substâncias fluorescentes como o corante de Hoechst e o DAPI ou iodeto de propídio. Estes são corantes fluorescentes que se ligam ao *DNA* e, como tal, o núcleo da célula torna-se visível (7).

Os sistemas de fluorescência são consideravelmente mais caros do que a microscopia ótica mas, se forem utilizados em estudos com culturas celulares, podem ser úteis na diferenciação entre células vivas e células mortas. Nas amostras onde as colorações de Giemsa ou com hematoxilina são usadas, todas as células são observadas mortas devido à sua fixação. Para diferenciar as células vivas das mortas utiliza-se uma substância que cora as células nas duas situações como por exemplo o corante de Hoechst, combinada com outra substância que cora apenas as células mortas, tal como o iodeto de propídio. Este método consiste na identificação da integridade da membrana plasmática celular. As células com membranas celulares intactas (células vivas) não são marcadas com iodeto de propídio, que apenas cora células mortas. As imagens de fluorescência permitem, também, a discriminação entre as células apoptóticas e necróticas (7).

1.3.2. Imuno-histoquímica - *TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling*

O método de *TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling* (TUNEL) fornece determinação de quebras de *DNA in situ*. Secções congeladas em blocos de parafina, ou células de cultura, podem ser facilmente analisadas por este método, que proporciona imagens claras de morte por apoptose. Os núcleos podem ser visualizados por métodos colorimétricos ou fluorométricos. As células apoptóticas têm aparência fragmentada e/ou condensada. As células normais estão coradas de verde, com verde de metileno ou de vermelho-azulado com hematoxilina (7).

A Figura 5 representa um exemplo de coloração com verde de metileno onde as células normais estão coradas de verde e as apoptóticas de castanho. No entanto, existem algumas limitações do ensaio de TUNEL. Alguns dos núcleos marcados podem, de facto, ser transcricionalmente ativos (células em proliferação). Além disso, a duração do tratamento proteolítico e a concentração de desoxinucleotidil transferase terminal (TdT) são fatores importantes que influenciam fortemente os resultados (7).

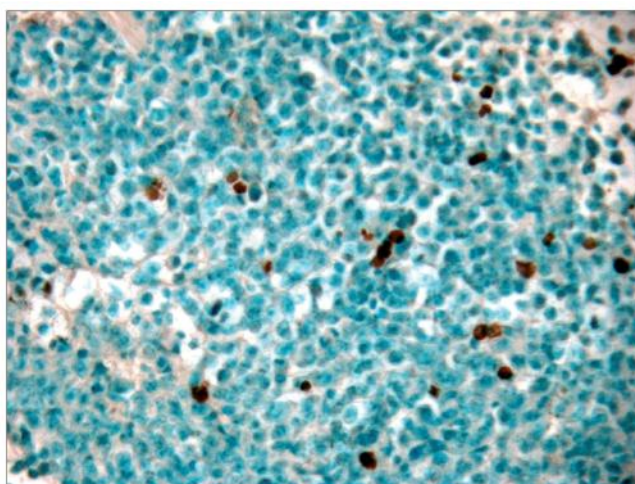


Figura 5 - Coloração de TUNEL em células tumorais de ratinho cultivadas. O Paclitaxel foi utilizado para induzir a apoptose. As células positivas estão coradas de castanho-escuro. O citoplasma pode também estar corado, devido à fuga de DNA clivado. Foi realizada a coloração de fundo com verde de metilo (Retirado de Ulukaya et al, 2011).

1.3.3. Citometria de fluxo - Anexina V/Isotiocianato de fluoresceína

Qualquer proteína de superfície, cuja expressão se altere, durante a apoptose, pode ser determinada por citometria de fluxo, através da utilização de um anticorpo marcado com uma substância fluorescente. Este método para detecção da apoptose é particularmente útil, devido à sua facilidade de aplicação, capacidade de fornecer resultados quantitativos e rapidez. A detecção da apoptose pode ser realizada através da utilização de iodeto de propídio ou de Anexina V marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (7).

Na detecção com iodeto de propídio, as células apoptóticas possuem uma diminuição de fluorescência e uma dispersão de luz (para a frente) diminuída, em comparação com as células do pico principal (G1). Assim, as células em apoptose são detetáveis antes do pico G1 (Fig. 6). A anexina V liga-se à fosfatidilserina que fica exposta no exterior da membrana plasmática durante a apoptose. Como um corante fluorescente (FITC) é ligado à anexina V, é possível detetar as células apoptóticas por citometria de fluxo. Neste método também pode ser usado outro corante fluorescente para detetar células necróticas concomitantemente. As células em apoptose também podem ser observadas em microscopia de fluorescência mas a citometria de fluxo proporciona uma análise muito mais rápida e precisa (7).

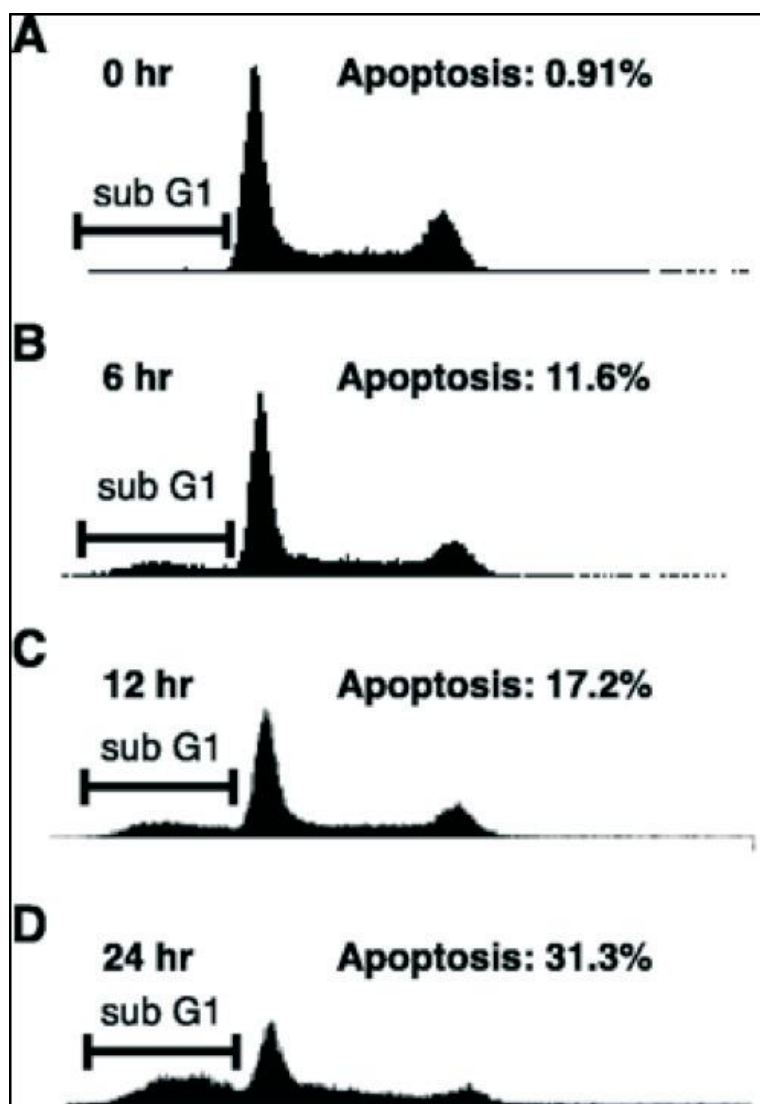


Figura 6 - Análise da apoptose por citometria de fluxo com iodeto de propídio. As células foram cultivadas até 50% de confluência num meio, depois mudadas para outro meio e colhidas após a indução da apoptose nos seguintes tempos: (A) 0 horas, (B) 6 horas, (C) 12 horas e (D) de 24 horas (Retirado de Ulukaya et al, 2011).

1.3.4. *Microarrays de DNA*

A tecnologia de *microarrays* de DNA (Fig.7) é um método novo e relativamente caro que permite detetar, simultaneamente, muitos genes numa única execução. É possível analisar as vias da apoptose bem como a citotoxicidade/genotoxicidade relacionadas (7).

A detecção de genes implicados de forma revelante na apoptose, por tecnologias que usem matrizes, poderá mudar radicalmente a medicina do futuro. Será possível obter muitas informações sobre a expressão de recetores de morte da superfície celular específicos da apoptose. Atualmente, algumas empresas introduzem matrizes novas e cada vez mais eficientes (7).

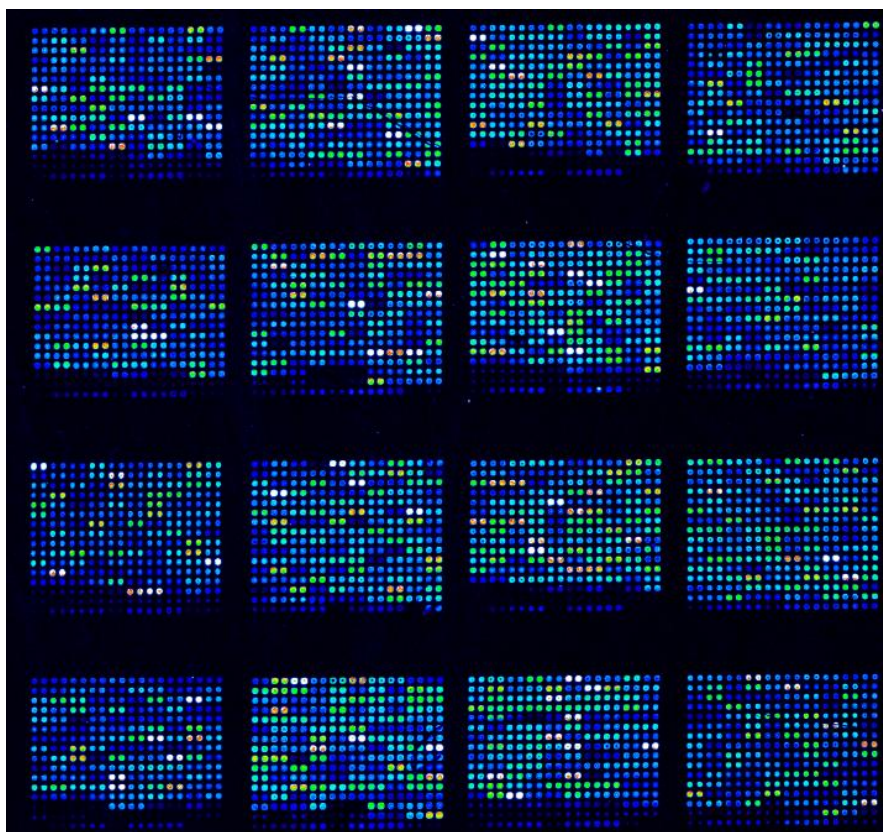


Figura 7 - Microarrays de DNA (Retirado de <http://serc.carleton.edu/cismi/itl/bioinformatics/index.html>).

2. Neoplasias hematopoiéticas

2.1. Definição

As neoplasias hematopoiéticas são cânceros primários do sangue e dos órgãos formadores de sangue (medula óssea e tecido linfóide) que incluem as leucemias, os linfomas e as displasias de plasmócitos (8).

As leucemias são neoplasias das células-tronco do sistema hematopoiético que se originam na medula óssea e, secundariamente, invadem o sangue circulante ou outros órgãos. Estas, podem ser da linhagem mielóide ou linfóide (9).

As doenças proliferativas da linhagem mielóide têm em comum a proliferação anormal das células mielóides ou granulocíticas. As anomalias da proliferação podem manifestar-se, de modo evidente, desde o início da doença, encontrando-se no sangue circulante um número elevado de células muito indiferenciadas, denominadas blastos mielóides como acontece nas leucemias mielóides agudas (LMA). No caso das leucemias mieloides crônicas (LMC) a proliferação dos granulócitos também é muito evidente, mas no sangue e na medula óssea são encontradas células maduras e há raras formas blásticas em circulação (10).

As doenças proliferativas da linhagem linfóide também podem ter quadro clínico agudo ou crônico. As linfoproliferações agudas são denominadas leucemias linfoblásticas agudas (LLA) e são caracterizadas pela grande percentagem de blastos linfóides ou linfoblastos (>20%) no sangue periférico e na medula óssea. As LLC têm uma evolução mais lenta, e as células proliferantes são linfócitos maduros (10).

Os linfomas correspondem a doenças tumorais que têm origem em linfócitos localizados nos gânglios linfáticos. A partir dessa localização, os linfócitos neoplásicos propagam-se a outros tecidos e órgãos, disseminando-se também pelo sangue e acabam por infiltrar a medula óssea (10).

As displasias dos plasmócitos, geralmente originadas na medula óssea, adquirem a forma de proliferações localizadas ou disseminadas de células produtoras de anticorpos (9).

2.2. Classificações

2.2.1. Classificação *French-American-British*

De acordo com o sistema de classificação *French-American-British* (FAB), as leucemias dividem-se em agudas e crónicas. As leucemias agudas dividem-se em LMA ou mieloblásticas e as LLA (11).

As LMA são, ainda, morfologicamente subclassificadas em oito tipos:

- M0 – LMA sem diferenciação morfológica;
- M1 – LMA com mínima diferenciação morfológica;
- M2 – LMA com diferenciação (componente monocítico < 20%);
- M3 – LMA promielocítica hipergranular;
M3 variante hipogranular;
- M4 – LMA mielomonocítica (células monocíticas \geq 20%);
- M5 – LMA monocítica (com células monocíticas \geq 20% das células leucémicas);
M5a – LMA monoblástica (sem diferenciação, blastos \geq 80%);
M5b – LMA monocítica (com diferenciação, blastos < 80%);
- M6 – eritroleucemia;
- M7 – LMA megacarioblástica;

As LLA são subclassificadas em três tipos:

- L1 – LLA com blastos monomórficos, regulares, com elevada razão núcleo:citoplasma;
- L2 – LLA com blastos heterogéneos, irregulares, com vários nucléolos e baixa razão núcleo:citoplasma;
- L3 – LLA com blastos hiperbasófilos, com citoplasma muito azul, com muitos vacúolos, com células tipo Burkitt;

As leucemias crónicas são divididas em LMC e LLC (11).

A classificação FAB está em desuso e está a ser substituída pela classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), que apresenta recomendações atualizadas e modificadas dos critérios de diagnóstico utilizados pela FAB, valorizando critérios citogenéticos (12).

O diagnóstico das leucemias era baseado exclusivamente na morfologia e na citoquímica do sangue e da medula óssea. Atualmente, o desenvolvimento de anticorpos monoclonais e a citometria de fluxo assumiram o papel principal para a definição precisa das células blásticas das linhagens linfóide e, também, da mielóide (12).

A classificação das leucemias agudas permite a correta separação dos doentes leucêmicos nas categorias LMA e LLA. No entanto, foi a partir dos sistemas de classificação, dos avanços nas técnicas de imunofenotipagem e devido à crescente importância dos eventos citogenéticos, que hoje há possibilidades de diagnósticos mais precisos, indicando fatores prognósticos e possibilitando uma terapia mais adequada a cada subtipo de leucemia (12).

2.2.2. Classificação da Organização Mundial de Saúde (2008)

Em 2001, a OMS, em colaboração com a Sociedade de Hematopatologia e a Associação Europeia de Hematologia (EHA), publicou uma classificação dos tumores do tecido hematopoiético e linfóide, como parte da 3ª edição da série, *Classificação de Tumores da OMS*, que reflete uma mudança de paradigma relativamente a regimes anteriores. Pela primeira vez, a informação genética foi incorporada com informação morfológica, citoquímica, imunológica e clínica em algoritmos de diagnóstico, para as neoplasias mielóides (13).

Em 2008, a *Classificação da OMS dos tumores do tecido hematopoiético e linfóide* foi atualizada e publicada como parte da 4ª edição da série da OMS. O objetivo da revisão era incorporar as novas informações científicas e clínicas que se acumularam desde a edição anterior, para refinar os critérios de diagnóstico para os tumores descritos anteriormente e para introduzir entidades de doença recém-reconhecidas (14).

Um esquema de classificação ideal de neoplasias hematopoiéticas deverá incluir doenças que são clinicamente significativas, claramente definidas, e que possam ser diagnosticadas utilizando tecnologia e dados atualmente disponíveis. Além disso, deve haver consenso geral e aceitação da classificação para que seja útil para a prática clínica diária, bem como servir como uma linguagem comum para ensaios clínicos e laboratórios de investigação (13, 14).

2.2.2.1. Princípios

A *Classificação da OMS dos tumores do tecido hematopoiético e linfóide* utiliza toda a informação disponível: morfologia, citoquímica, imunofenotipagem, genética e características clínicas, para definir entidades clinicamente significativas da doença. É uma classificação de consenso, em que um certo número de especialistas chegaram a acordo sobre a classificação e os critérios diagnósticos utilizados para a definição das entidades que a compõem. Em geral, a classificação estratifica neoplasias de acordo com a linhagem (mielóide, linfóide, histiocítica/dendrítica) e distingue neoplasias de células precursoras e maduras (13, 14).

Na classificação da OMS deve haver acordo sobre os critérios de diagnóstico e a nomenclatura, entre um número considerável de especialistas na área. A chave para o desenvolvimento da quarta edição foi a entrada de cerca de 70 médicos, reconhecidos internacionalmente, e cientistas clínicos que se reuniram com os patologistas para discutir os méritos do esquema de classificação proposto e as revisões. Eventualmente, mais de 150 hematopatologistas, hematologistas clínicos e cientistas participaram no final do desenvolvimento e na escrita da 4^a edição da *Classificação da OMS dos tumores do tecido hematopoiético e linfóide* (14).

2.2.2.2. Critérios

A *Classificação da OMS dos tumores do tecido hematopoiético e linfóide* utiliza critérios de diagnóstico morfológicos, imunofenotípicos, citogenéticos e clínicos. As anomalias genéticas desempenham um papel importante para posterior sub-classificação de algumas neoplasias mielóides, tais como a LMA (13, 14).

A contribuição relativa de cada um destes parâmetros para o diagnóstico final varia, dependendo da entidade de doença. Para algumas neoplasias, a morfologia pode ser suficiente para a classificação mas, noutros casos, o conhecimento da lesão genética é necessário para o diagnóstico final e classificação e, frequentemente, para o tratamento. A LMC serve como um bom exemplo da abordagem e objetivo da classificação da OMS para uma doença individual. É reconhecida principalmente pelas suas características clínicas e morfológicas mas, é consistentemente associada com uma alteração genética específica, o gene de fusão *Breakpoint Cluster Region/Abelson*

Leukemia Vírus (BCR-ABL)1, que resulta na produção de uma tirosina-cinase (TC) ativada que, por sua vez, ativa diferentes vias celulares, influencia a proliferação, sobrevivência e diferenciação das células neoplásicas. A proteína fornece um alvo para terapia com inibidores das TC, que têm prolongado a vida de milhares de doentes. No entanto, o diagnóstico de LMC não é efetuado com base num parâmetro único, pois existem outras doenças que podem mimetizar a sua apresentação, morfologia e clínica. O gene *BCR-ABL1* também é encontrado em casos de LLA e leucemia aguda de fenótipo misto (14).

Para as neoplasias linfóides maduras existe uma sub-classificação que se baseia, em certa medida, na fase de diferenciação (linfoma das células do manto e folicular), na morfologia (o linfoma difuso de grandes células B), na apresentação clínica (linfoma difuso de grandes células B associado a inflamação crónica) ou, mais frequentemente, na combinação de parâmetros morfológicos, imunofenotípicos e/ou genéticos que permitem, em conjunto, definir uma entidade de doença específica. Para as neoplasias mielóides, existe também uma sub-classificação baseada, principalmente, no seu padrão de maturação e características biológicas gerais (14).

A nomenclatura revista tem alguns desvios significativos em relação à edição anterior da *Classificação da OMS dos tumores do tecido hematopoiético e linfóide*. Há reconhecimento de que, para algumas neoplasias linfóides, a idade do doente e o local da neoplasia podem estar tão intimamente ligados à biologia do tumor, que esta informação é incluída na nomenclatura. Exemplos de neoplasias relacionadas com a idade pediátrica incluem o linfoma folicular que, geralmente, se apresenta como doença localizada e um alto grau histológico, geralmente com um bom prognóstico. O linfoma difuso de grandes células B (LDGCB), com o vírus de Epstein-Barr (EBV) positivo, dos idosos, surge provavelmente devido à vigilância imunitária em indivíduos com mais de 50 anos. Estes, clinicamente são linfomas agressivos (14).

A localização de alguns tumores tem um impacto sobre a sua biologia denotando uma entidade específica. Um exemplo disso é o LDGCB do sistema nervoso central, que possui uma expressão de genes distinta, e o linfoma cutâneo primário difuso de grandes células B da perna que tem, geralmente, uma forma mais agressiva do que os outros linfomas de grandes células B (14).

A 4^a edição da *Classificação da OMS dos tumores do tecido hematopoiético e linfóide* tentou definir mais claramente os critérios de diagnóstico mínimos para algumas neoplasias hematopoiéticas, em que a fronteira entre neoplásica e "pré-

neoplásicas" nem sempre é clara. Os estudos imunofenotípicos e genotípicos de sangue, medula óssea e amostras de gânglios linfáticos, por vezes, revelam pequenas populações de células com alterações fenotípicas ou genéticas em indivíduos assintomáticos, nos quais, muitas vezes, não está claro se a anomalia é uma lesão precursora ou se é preditiva de doença no futuro (14).

A *Classificação da OMS dos tumores do tecido hematopoiético e linfóide* de 2008 também reconhece que, por vezes, algumas neoplasias apresentam características que se sobrepõem em diferentes entidades biológicas, tornando a classificação difícil, se não impossível. Dois exemplos incluem linfoma de células B inclassificável, com características intermediárias entre o LDGCB e o de Hodgkin clássico e, também, o linfoma de células B inclassificável, com características intermediárias entre o LDGCB e o de Burkitt (14).

A *Classificação da OMS dos tumores do tecido hematopoiético e linfóide* de 2008 (Tabela 2) inclui cinco subgrupos de neoplasias mielóides: (1) neoplasias mieloproliferativas (NMP), (2) neoplasia mielóide/linfóide com eosinofilia e anomalias de *PDGFRA*, *PDGFRB* ou *FGFR1*, (3) neoplasias mielodisplásicas (NMD), (4) neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas (NMD/NMP), e (5) LMA (15).

As NMP, são desordens clonais de células progenitoras hematopoiéticas caracterizadas pela proliferação de uma ou mais linhagens (mielóide, eritróide e/ou megacariocítica). As NMP são sub-classificadas em oito entidades separadas: LMC, policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE), mielofibrose primária (MFP), mastocitose sistêmica (MS), leucemia eosinofílica crónica, sem outra especificação (LEC, NOS), leucemia neutrofílica crónica (LNC) e NMP inclassificável (NMP, U) (16).

As neoplasias NMD/NMP são neoplasias mielóides clonais que têm algum quadro clínico, laboratorial ou achados morfológicos, que suportam um diagnóstico de síndrome mielodisplásica, e outros dados que são mais consistentes com NMP (15).

A LMA é uma doença heterogénea caracterizada por proliferação de um clone maligno com pouca diferenciação e proliferação excessiva de blastos. Uma LMA é definida como uma alteração clonal causada pela transformação maligna de pelo menos uma linhagem da medula óssea. Em geral ocorre uma proliferação aumentada, sem ou com pouca diferenciação, resultando em insuficiência hematopoiética (isto é, granulocitopenia, trombocitopenia e/ou anemia) (17).

Tabela 2 - Classificação dos tumores do tecido hematopoiético e linfóide (OMS 2008)

Neoplasias mieloproliferativas
Leucemia mielóide crônica, <i>BCR-ABL1</i> positivo
Leucemia neutrofílica crônica
Policitemia vera
Mielofibrose primária
Trombocitemia essencial
Leucemia eosinofílica crônica, NOS
Mastocitose
Mastocitose cutânea
Mastocitose sistêmica
Leucemia a mastócitos
Sarcoma de mastócitos
Mastocitoma extracutâneo
Neoplasia mieloproliferativa, inclassificável
Neoplasias mielóides e linfóides com eosinofilia e anomalias <i>PDGFRA</i>, <i>PDGFRB</i> ou <i>FGFR1</i>
Neoplasias mielóides e linfóides com rearranjo <i>PDGFRA</i>
Neoplasias mielóides com rearranjo <i>PDGFRB</i>
Neoplasias mielóides e linfóides com anomalias <i>FGFR1</i>
Neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas
Leucemia mielomonocítica crônica
Leucemia mielóide crônica atípica, <i>BCR-ABL1</i> negativo
Leucemia mielomonocítica juvenil
Neoplasia mielodisplásica/mieloproliferativa, inclassificável
<i>Anemia refratária com sideroblastos em anel associados com trombocitose acentuada</i>
Neoplasias mielodisplásicas
Citopenia refratária com displasia
Anemia refratária
Neutropenia refratária
Trombocitopenia refratária
Anemia refratária com sideroblastos em anel
Citopenia refratária com displasia multilinhagem
Anemia refratária com excesso de blastos
Síndrome mielodisplásica associada a del (5q)
Síndrome mielodisplásica inclassificável
Síndrome mielodisplásica na infância
<i>Citopenia refratária da infância</i>
Leucemia mielóide aguda (LMA) relacionada com neoplasias precursoras
LMA com anomalias genéticas recorrentes
LMA com t (8; 21) (q22, q22), <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
LMA com inv (16) (p13.1q22) ou t (16, 16) (P13.1; p22); <i>CBFB-MYH11</i>
Leucemia promielocítica aguda, com t (15, 17) (q22, q12); <i>PML-RARA</i>
LMA com t (9; 11) (p22, q23) <i>MLLT3-MLL</i>
LMA com t (6;9) (p23, q34); <i>DEK-NUP214</i>
LMA com inv (3) (q21q26.2) ou t (3,3) (q21; q26.2); <i>RPN1-EV11</i>
LMA (megacarioblástica) com t (1;22) (p13, q13); <i>RBM15-MKL1</i>
LMA com <i>NPM1</i> mutado

LMA com CEBPA mutante
LMA com mielodisplasia
Neoplasias mielóides relacionadas com a terapia
Leucemia mielóide aguda, NOS
LMA com diferenciação mínima
LMA sem maturação
LMA com maturação
Leucemia mielomonocítica aguda
Leucemia monocítica e monoblástica aguda
Leucemia eritróide aguda
Leucemia megacarioblástica aguda
Leucemia a basófilos aguda
Panmielose aguda com mielofibrose
Sarcoma mielóide
Proliferações mielóides relacionadas com a síndrome de Down
Mielopoiese anormal transitória
Leucemia mielóide associada com a síndrome de Down
Neoplasia blástica plasmocitóide de células dendríticas
Leucemias agudas de linhagem ambígua
Leucemia aguda indiferenciada
Leucemia aguda com fenótipo misto t (9, 22) (q34; q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
Leucemia aguda com fenótipo misto t (v; 11q23); <i>MLL</i> reorganizados
Leucemia aguda com fenótipo misto, B / mielóide, NOS
Leucemia aguda com fenótipo misto, T / mielóide, NOS
<i>Leucemia/linfoma linfoblástico de células natural killer (NK)</i>
Leucemias precursoras de neoplasias linfóides
Leucemia/linfoma linfoblástico B
Leucemia/linfoma linfoblástico B, NOS
Leucemia/linfoma linfoblástico B com anomalias genéticas recorrentes
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t (9; 22) (q34; q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t (v; 11q23); <i>MLL</i> reorganizados
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t (12, 21) (p13, q22) <i>TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com hiperdiploidia
Leucemia/linfoma linfoblástico B com hipodiploidia ALL
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t (5, 14) (q31, q32) <i>IL3 IGH</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t (1, 19) (q23; p13.3); <i>E2A-PAX1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico T
Neoplasias de células B maduras
Leucemia linfocítica/Linfoma pequeno linfocítico crónico
Leucemia prolinfocítica de células-B
Linfoma de células B da zona marginal esplénica
Tricoleucemia
<i>Leucemia/linfoma de células B esplénico, inclassificável</i>
<i>Linfoma difuso de células B esplénico da polpa vermelha pequeno</i>
<i>Tricoleucemia-variante</i>
Linfoma linfoplasmocitário
Macroglobulinemia de Waldenström

Doenças das cadeias pesadas α , γ e μ
Mieloma das células plasmáticas
Plasmocitoma solitário do osso
Plasmocitoma extraósseo
Linfoma extranodal de zona marginal do tecido linfóide associado à mucosa (linfoma MALT)
Linfoma nodal de zona marginal
<i>Linfoma nodal de zona marginal pediátrico</i>
Linfoma folicular
<i>Linfoma folicular pediátrico</i>
Linfoma cutâneo primário centro-folículo
Linfoma de células do manto
Linfoma difuso de grandes células B (LDGCB), NOS
Linfoma rico em grandes células B/células T/histiócitos
LDGCB primário do SNC
LDGCB cutâneo primário, da perna
<i>LDGCB EBV positivo dos idosos</i>
LDGCB associado à inflamação crónica
Granulomatose linfomatóide
Linfoma de grandes células B primário do mediastino (timo)
Linfoma de grandes células B intravascular
Linfoma de grandes células B, ALK positivo
Linfoma plasmablastico
Linfoma de grandes células B, provenientes de HHV8 associado a doença de Castleman multicêntrica
Linfoma primário
Linfoma de Burkitt
Linfoma de células B, inclassificável, com características intermediárias entre o linfoma difuso de grandes células B e linfoma de Burkitt
Linfoma de células B, inclassificável, com características intermediárias entre o linfoma de grandes células B difuso e linfoma de Hodgkin clássico
Neoplasias de células T e de células NK maduras
Leucemia prolinfocítica de células T
Leucemia linfocítica de grandes células T granulares
<i>Doença linfoproliferativa crónica de células NK</i>
Leucemia agressiva de células NK
Doença linfoproliferativa de células T, EBV positiva, sistémica da infância
Linfoma hidro vaciniforme-like
Leucemia/linfoma de células T, adulto
Linfoma de células T/NK extranodal, tipo nasal
Enteropatia associada ao linfoma de células T
Linfoma de células T hepatoesplénico
Linfoma de células T, paniculite subcutânea
Doenças linfoproliferativas cutâneas primárias de células T CD30 positivas
Papulose Linfomatóide
Linfoma cutâneo primário anaplásico de grandes células
Linfoma cutâneo primário gama-delta de células T
<i>Linfoma cutâneo primário agressivo epidermotrópico de células T citotóxicas CD8 positivo</i>

<i>Linfoma cutâneo primário de pequenas/médias células T, CD4 positivo</i>
Linfoma periférico de células T, NOS
Linfoma de células T angioimunoblástico
Linfoma anaplásico de células grandes, ALK positivo
<i>Linfoma anaplásico de células grandes, ALK negativo</i>
Linfoma de Hodgkin
Nodular linfócito predominante
Clássico
Clássico com esclerose nodular
Clássico com celularidade mista
Clássico pobre em linfócitos
Neoplasias de células dendríticas e histiocíticas
Sarcoma histiocítico
Histiocitose de células de Langerhans
Sarcoma de células de Langerhans
Sarcoma de células dendríticas interdigitais
Sarcoma de células dendríticas foliculares
Tumor de células fibroblásticas reticulares
Tumor de células dendríticas indeterminado
Xantogranuloma juvenil disseminado
Doenças linfoproliferativas pós-transplante (DLPT)
Hiperplasia plasmocitária
DLPT semelhante a mononucleose infecciosa
DLPT polimórfica
DLPT monomórfica (tipos de células B e T/NK) ^a
DLPT linfoma tipo Hodgkin clássico ^a

NOS – Not otherwise specified Os números em itálico são códigos provisórios para a 4^a edição.

Enquanto se espera que sejam incorporadas na próxima edição, que atualmente continuam sujeitas a alterações. Os tipos histológicos em itálico são entidades provisórias, para que o grupo de trabalho para o qual não havia provas suficientes para ser reconhecido como doença distinta neste momento. a - Estas lesões são classificadas de acordo com o linfoma ou leucemia a que correspondem, e é atribuído o respetivo código.

A leitura da tabela 2 revela que as neoplasias hematopoiéticas são estratificadas amplamente e de acordo com a linhagem das células neoplásicas, em: mielóide, linfóide, histiocítica/dendrítica, ou ambígua. Esta última categoria é composta de neoplasias de células precursoras (leucemia aguda) que não possuem quaisquer marcadores específicos de linhagem associados, (indiferenciadas), ou expressam antígenos de mais de uma linhagem (fenótipo misto). Neoplasias compostas por células precursoras (LMA, linfoma linfoblástico, leucemia blástica plasmocitóide, neoplasia de células dendríticas e leucemia aguda de linhagem ambígua) são consideradas separadamente das de células mais maduras (NMP, NMD/NMP, NMD, linfomas maduros de células B e T/ linfoma de células NK, linfoma Hodgkin e neoplasias de células histiocíticas/dendríticas) (14).

As propostas de revisão e reconhecimento de novas entidades para a 4^a edição da *Classificação da OMS dos tumores do tecido hematopoiético e linfóide (OMS 2008)* foram baseadas em estudos publicados em literatura recente. Os dados mais atuais têm de ser bem comprovados e o seu significado deve ser amplamente reconhecido. Para acomodar informação mais recente, bem como questões controversas, uma série de "entidades provisórias" foram incluídas na classificação. Estas, foram recentemente descritas, ou são patologias clinicamente e/ou cientificamente importantes e devem ser consideradas para a classificação. No entanto, são necessários estudos adicionais para clarificar a sua importância e na tabela 2 estão assinaladas em *itálico* (14).

3. Farmacoterapia das neoplasias hematopoiéticas: alvos moleculares

O conhecimento detalhado dos mecanismos reguladores da apoptose é essencial para a compreensão da patogênese das doenças malignas, bem como para o desenvolvimento de terapias mais eficazes, dirigidas a alvos específicos. A figura 8 mostra as principais vias apoptóticas e as proteínas alvo reguladoras da apoptose (anti e pró-apoptóticas) (18).

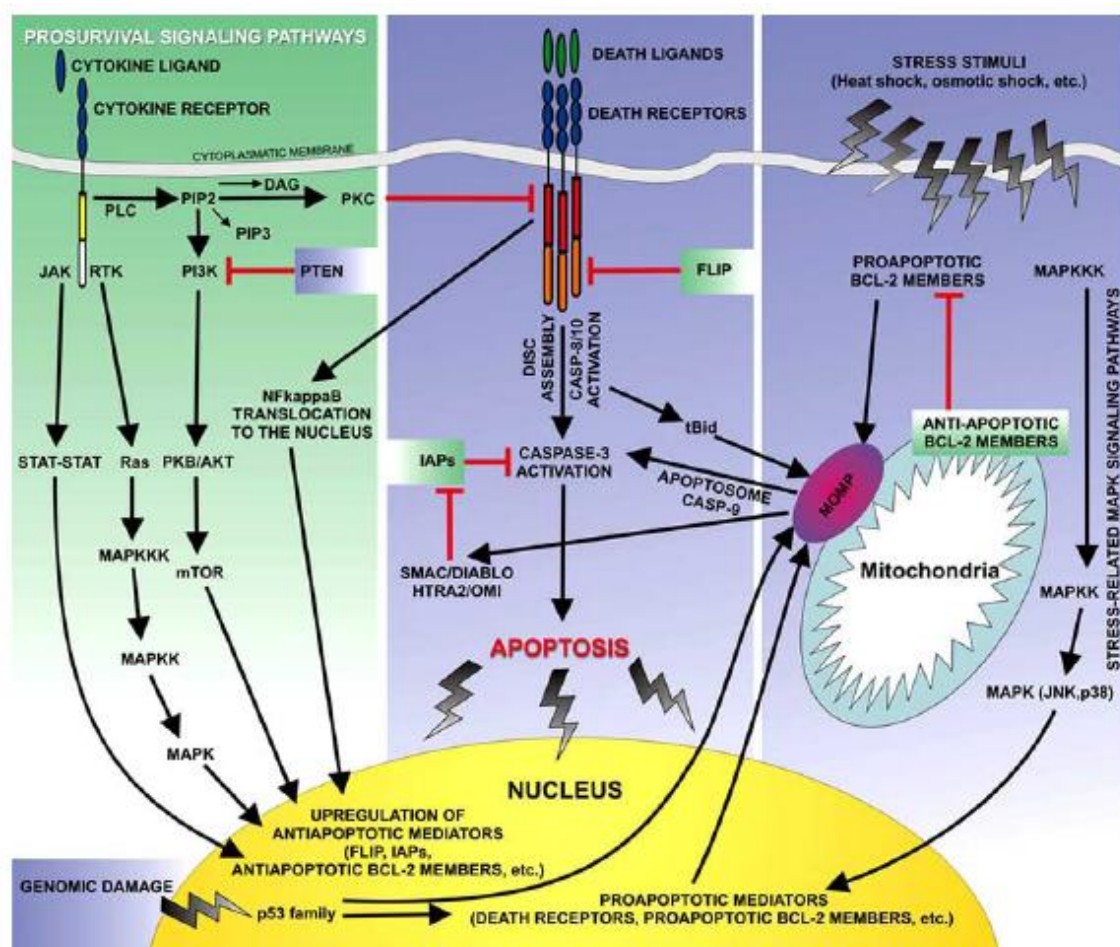


Figura 8 - Regulação da apoptose e interações moleculares entre as vias apoptóticas. JAK: janus kinase; STAT: signal transducers and activators of transcription; RTK: receptor tyrosine kinase; MAPK(K(K)): mitogen activated protein kinase (kinase (kinase); PI3K: phosphoinositide-3-kinase, PIP2: phosphatidylinositol-bisphosphate; DAG: diacylglycerol; PKB/AKT: protein kinase B/v-akt murine thymoma viral oncogene homolog; PLC: phospholipase C; PTEN: phosphatase and tensin homolog; mTOR: mammalian target of rapamicin; PKC: protein kinase C, NF-kB, nuclear factor kappa-B, FLIP, FADD-like interleukin-18-converting enzyme (FLICE)-inhibitory; DISC, death inducing signaling complex; IAP: inhibitors of apoptosis protein; SMAC: Second mitochondria-derived activator of caspases; BID: BH3 interacting domain death agonist; MOMP: mitochondrial outer membrane permeabilization; (Retirado de Zivny et al, 2010).

No painel esquerdo estão representadas as cascatas de sinalização da sobrevivência celular, tais como: JAK-STAT, RTK, PKC, PI3K-PKB/AKT e MAPK, que são ativadas principalmente por citocinas ou fatores de crescimento celular. O sinal é transmitido a partir dos recetores, ativados por meio de um conjunto complexo de mediadores moleculares, para o núcleo, provocando alterações da expressão de genes alvo. A *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) regula negativamente a via de sinalização PKB/AKT e funciona como gene supressor de tumores (18).

O painel central apresenta vias apoptóticas extrínsecas que são desencadeadas pela ligação dos ligandos aos respetivos recetores de morte. A agregação dos recetores de morte induz o *death-inducing signaling complex* (DISC), que leva à ativação das caspases e à propagação do sinal de apoptose. A clivagem da Bid cria um ciclo de amplificação mitocondrial pró-apoptótica da via extrínseca. A apoptose induzida pelos recetores de morte pode ser regulada pela *FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme* (FLICE)-inhibitory (FLIP), antagonista associado ao DISC, pela inativação da caspase-8 (18).

O painel direito apresenta vias apoptóticas intrínsecas, que são ativadas por uma grande variedade de estímulos de stresse ambiental (choque térmico, retirada de fatores de crescimento, etc...), ou a partir do interior da célula (o stresse genómico ou do retículo endoplasmático), e resultam na permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP). O apoptossoma subsequente e a ativação de caspases resultam no aumento da propagação do sinal de apoptose. Além disso, muitos estímulos de stresse também podem conduzir a sobre-expressão de moléculas pró-apoptóticas, que resultam no aumento do sinal apoptótico. Outras moléculas libertadas, após permeabilização da membrana mitocondrial externa, tais como a *second mitochondria-derived activator of caspases* (SMAC)/Diablo e a *high temperature requirement protein A2* (HTRA2)/OMI consolidam a propagação do sinal apoptótico, pelo bloqueio dos IAP (18).

3.1. Anti-apoptóticos

3.1.1. Via Intrínseca

3.1.1.1. Família dos inibidores das proteínas da apoptose

Os IAP são importantes reguladores da apoptose. O XIAP é o mais potente entre eles, e é sobre-expresso em várias neoplasias hematológicas. A sua atividade é endogenamente antagonizada pela SMAC/Diablo, e também por pequenas moléculas que mimetizam a Smac e que podem induzir a apoptose em células tumorais. Os IAPs compreendem uma família de pelo menos oito proteínas, tais como, cIAP1, cIAP2, XIAP e survivina, que comprometem a apoptose através do bloqueio ou da inativação de caspases. No entanto, apenas alguns deles, como o XIAP, podem antagonizar as caspases interferindo diretamente com a sua atividade. O XIAP, para além da inibição direta das caspases-3, 7 e 9, atua como um ativador da via do fator nuclear kappa B (NF-kB) (18-20).

Os inibidores naturais dos IAPs, a SMAC/Diablo e a HTRA2/OMI, são libertados juntamente com o citocromo c da mitocôndria durante a indução intrínseca da apoptose, competindo com as caspases para a ligação aos IAP (18).

Foram concebidas duas abordagens terapêuticas para moléculas alvo dos IAP: oligonucleótidos anti-sense e inibidores de pequenas proteínas que mimetizam a atividade bloqueadora da proteína endógena SMAC/Diablo. O XIAP representa um potencial alvo da terapia anticancerígena. Os antagonistas do XIAP baseados na polifenilureia têm demonstrado induzir a apoptose em diversas linhagens de células leucémicas (18-20).

O mimético da Smac LBW242, de baixo peso molecular, demonstrou melhorar a morte de células mutantes da linhagem Susan McDonough do vírus do sarcoma felino (FMS)-like tyrosine kinase 3 (FLT3) de LMA, que eram resistentes ao inibidor da proteína tirosina-cinase PKC412, quando combinado, quer com este, quer com medicamentos quimioterápicos padrão. No mieloma múltiplo (MM), o LBW242 mostrou provocar a apoptose em células resistentes a terapias convencionais ou ao bortezomib (19).

Num estudo clínico de fase I do AEG35156, um oligonucleótido anti-sense do XIAP, administrado por infusão intravenosa contínua, foi relatado que um doente com

linfoma não-Hodgkin mostrou uma diminuição marcada dos linfoblastos periféricos durante a administração deste fármaco (19).

3.1.1.2. Família *B-cell lymphoma 2*

Alguns alvos para a terapia anti-neoplásica são os membros anti-apoptóticos da família de proteínas Bcl-2, tais como, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, entre outras, que se ligam ao domínio BH3 de proteínas pró-apoptóticas e as inativam (21).

A tabela 3 mostra as proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 mais estudadas, tal como, o seu mecanismo de ação e a localização celular.

Tabela 3– Propriedades de membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 (Adaptado de Tzifi et al, 2012).

	Ação	Mecanismo de ação	Localização Celular
Bcl-2	Anti-apoptótica	Inibe a apoptose pela preservação da integridade da membrana mitocondrial	Membrana mitocondrial externa Envelope nuclear Membrana do retículo endoplasmático
Bcl-xL	Anti-apoptótica	Inibe a libertação do citocromo c através dos poros mitocondriais que inibe a ativação da cascata das caspases	Molécula transmembranar na mitocôndria
Bcl-w	Anti-apoptótica	Reduz a apoptose sob condições citotóxicas	Exclusivamente na mitocôndria
Mcl-1	Anti-apoptótica	Tempo de semi-vida curto, interação com Bak, Noxa, Bcl2L11, Bad, PCNA	Mitocôndria, núcleo

A elevada expressão de membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 confere, frequentemente, resistência à apoptose em células cancerígenas. A sobre-expressão de Bcl-2, um regulador anti-apoptótico, é característica do linfoma folicular. A desregulação de Bcl-2 é comum na LLC, no LDGCB, no MM e em LMA e LLA. O EBV, está implicado no desenvolvimento do linfoma de Burkitt, dos linfomas relacionados com o *HIV*, e doenças linfoproliferativas pós-transplante (DLPT). A sobre-expressão de Mcl-1, outra molécula anti-apoptótica da família Bcl-2, também é comum no MM e na LLC (18, 19, 22, 23).

A tabela 4 mostra os membros da família Bcl-2 envolvidos em alguns tipos de leucemia, tal como, a sua correlação com a sobrevivência, a progressão da doença e resistência à quimioterapia.

Tabela 4 – Membros da família Bcl-2 em diferentes tipos de leucemias (Adaptado de Tzifi et al, 2012).

Tipo de leucemia	Membros da família Bcl-2 envolvidos na doença	Correlação com sobrevivência e prognóstico
LLA	Níveis elevados: Bcl-2, Bax, Mcl-1	Sem correlação Aumento de Mcl-1 leva a resistência à quimioterapia
LMA	Níveis elevados: Bcl-2, Bcl-xL, Bad, razão Bcl-2/Bax elevada especialmente nos subtipos M4, M5, M6 e nos blastos CD34 ⁺	Aumento de Bcl-2 e Fas sem correlação Aumento de Bad e Bax e razão Bcl-2/Bax elevada levam a prognóstico pior
LLC	Níveis elevados: Bcl-2, Bcl-w, Bad, Bak, Bax, razão Bcl-2/Bax elevada Sem participação de Bik e Bcl-xL	Resultados conflituosos Aumento de Mcl-1, Bax, Bag-1 e Bcl-2 levam a resistência à quimioterapia
LMC	Níveis elevados: Mcl-1, Bcl-2 Níveis baixos de Bim	Bcl-2: proteína chave na progressão da doença

Foram desenvolvidas estratégias para regular/bloquear a expressão de membros anti-apoptóticos da família Bcl-2. A abordagem inclui os oligonucleótidos anti-sense para membros anti-apoptóticos Bcl-2 como o Oblimersen sódico/G3139 que foi concebido para se ligar aos primeiros seis codões do RNAm da proteína Bcl-2. O Oblimersen mostrou efeitos anti-tumorais fortes, dependentes da dose, *in vitro* e *in vivo*, em vários estudos e foi, também, capaz de potenciar os efeitos de vários agentes citostáticos, de anticorpos monoclonais, de esteroides e de radiações (18, 21).

Alguns estudos de fase II e III do Oblimersen, em combinação com a quimioterapia convencional, têm apresentado resultados encorajadores em doentes com linfoma não-Hodgkin (LNH), LLC-B, e LMA. O Oblimersen, em combinação com a quimioterapia, obteve respostas melhores do que a quimioterapia sozinha. Outras estratégias anti-sense incluem os oligonucleótidos anti-sense para Bcl-xL, anti-sense biespecífico para Bcl-2/Bcl-xL e os oligonucleótidos anti-sense para Mcl-1 (18, 21).

Dos ensaios clínicos com o Oblimersen sódico, referidos na tabela 5, destacam-se as neoplasias hematopoiéticas, nomeadamente as LLC, o MM e as LMA.

Tabela 5 – Ensaios clínicos de Fase II e III com Oblimersen sódico (Adaptado de Kang et al, 2009).

Disease (group)	Phase	Regimen
Melanoma	III	Dacarbazine ± oblimersen
CLL	III	FC ± oblimersen
MM	III	Dexamethasone ± oblimersen
NSCLC or SCLC	III	Docetaxel ± oblimersen
AML (CALGB)	III	Ara-C/daunorubicin + HiDAC + oblimersen
SCLC (CALGB)	II	Carboplatin/etoposide ± oblimersen
AML	II (nR)	Gemtuzumab ± oblimersen
HRPCa (EORTC)	II (nR)	Docetaxel ± oblimersen
Renal Ca	II (nR)	IFN- α + oblimersen
MM	II (nR)	Dexamethasone/ thalidomide + oblimersen
CLL	I/II (nR)	Oblimersen
Hepatocellular	I/II (nR)	Doxorubicin + oblimersen

MM, multiple myeloma; NSCLC, non-small cell lung cancer; SCLC, small cell lung cancer; HRPCa, hormone-refractory prostate cancer; Renal Ca, renal cell cancer; HiDAC, high-dose cytosine arabinoside; nR, not randomized; CALGB, Cancer and Leukemia Group B; EORTC, European Organization of Research and Treatment of Cancer; IFN, interferon; FC, fludarabine/cyclophosphamide.

Dentro dos agentes farmacológicos das proteínas alvo anti-apoptóticas Bcl-2, referem-se os seguintes: gossypol e o seu enantiómero oral AT-101, os compostos miméticos BH3 como o ABT-737 e o seu análogo oral ABT-263 e o obatoclax também designado GX15-070 (tabela 6).

Tabela 6 – Agentes alvo das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 (Adaptado de Kang et al, 2009).

Agents	Target proteins
Apogossypol	Bcl-2, Bcl-X _L , Mcl-1
HA-14	Bcl-2
Antimycin A	Bcl-2, Bcl-X _L
BH3Is	Bcl-X _L
Oblimersen sodium	Bcl-2
Gossypol (AT-101)	Bcl-2, Bcl-X _L , Bcl-w, Mcl-1
ABT-737 (ABT-263)	Bcl-2, Bcl-X _L , Bcl-w
GX15-070	Bcl-2, Bcl-X _L , Bcl-w, Mcl-1

A atividade anti-tumoral do gossypol é devida, em parte, à inibição das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xL e à subsequente indução da apoptose. Foram testadas a segurança e a eficácia do AT-101, o enantiómero (-) gossypol (oralmente disponível) em vários ensaios clínicos, nomeadamente, os de fase II, em combinação com a

lenalidomida e em ensaios de fase III, em combinação com o rituximab, ambos para a LLC (24, 25).

Alguns estudos de grande interesse investigaram inibidores da família Bcl-2, como o ABT-737 e o ABT-263 (navitoclax). Estes são compostos miméticos de BH3 estruturalmente semelhantes a Bad. O ABT-737 liga-se com elevada afinidade aos membros anti-apoptóticos Bcl-2 (com a exceção de Mcl-1) e demonstrou induzir a morte celular em vários tipos de cancro, incluindo neoplasias hematológicas. O ABT-737 e o seu análogo oral ativo ABT-263 (Fig.9) têm sido extensamente avaliados para alvos da apoptose em células cancerígenas. O ABT-737 tem uma ampla gama de atividade como agente único, contra as linhas celulares da LLA. Células primárias de doentes com LLA, LMA, LLC, linfoma folicular e linfoma da zona marginal, demonstraram ser sensíveis ao tratamento com ABT-737. Além disso, o fármaco demonstrou aumentar a atividade anti-neoplásica da vincristina, da dexametasona e L-asparaginase, na LLA pediátrica (18, 19, 23, 25).

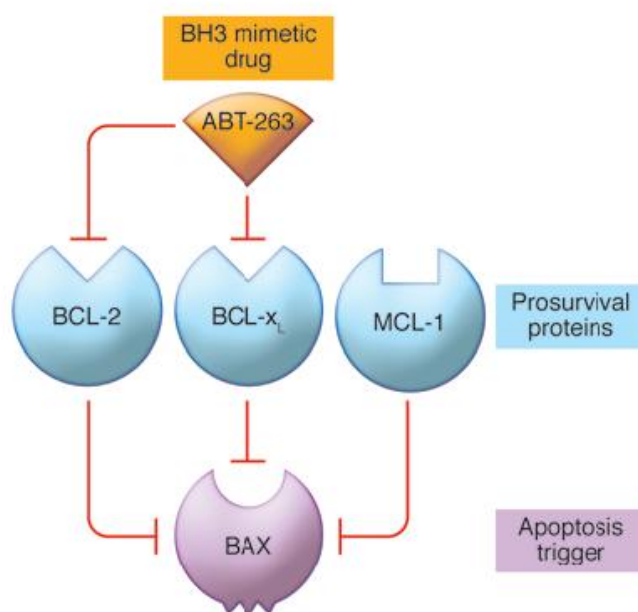


Figura 9 – Estratégias farmacológicas com um composto mimético BH3 para reativar a morte celular em neoplasias hematológicas refratárias (Adaptado de Adams, J. M., 2012).

As células que expressam Mcl-1 são resistentes ao ABT-737. Como a ligação ABT-737/Mcl-1 é fraca e como a morte celular provocada por ABT-737 é fortemente dependente da função endógena normal de Bax e Bak1, a desregulação dessas moléculas (sobre-expressão de Mcl-1, e mutação de Bax/Bak1) representam os

principais determinantes moleculares da resistência das células cancerígenas a ABT-737. A resistência causada por Mcl-1 pode ser atenuada pela adição de agentes que podem diminuir Mcl-1, tais como o seliciclib, um inibidor de cinases dependentes de ciclinas (CDC) (18, 23-25).

Das pequenas moléculas inibidoras (PMI) de proteínas pró-sobrevivência Bcl-2, o mimético BH3 ABT-737, é um dos compostos mais promissores descobertos até à data. Mata seletivamente as células cancerígenas através da interação direta com a família Bcl-2. Esta proteína foi eficaz na ativação da apoptose em células duplamente deficientes em Bax e Bak. O ABT-263 é a sua versão oral que inibe as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xL e Bcl-w, e tem demonstrado eficácia em linhas celulares de leucemia e linfoma *in vitro* e *in vivo* (24).

O inibidor de Bcl-2, obatoclax/GX15-070, parece ser ativo contra um amplo espectro de membros inibidores Bcl-2, incluindo Mcl-1. Ensaios pré-clínicos mostraram a eficácia de obatoclax sozinho ou em combinação com outros agentes anti-cancerígenos, como o bortezomib, em várias neoplasias hematológicas, incluindo o linfoma de células do manto, o MM e as leucemias mielóides. O obatoclax está em ensaios clínicos para o tratamento de LLC e LMA, linfoma de células do manto e MM. A pequena molécula obatoclax/GX15-070 antagoniza Mcl-1 e supera a resistência à apoptose mediada por este. Atua em sinergia com o bortezomib no linfoma de células do manto (18, 19).

O obatoclax induz a apoptose mediada pela Bak e também pode antagonizar Mcl-1. Atua através do bloqueio da ligação de Bak a Mcl-1, induzindo a via intrínseca da apoptose. Foi demonstrada eficácia pré-clínica em linfoma do manto e em MM, como agente único e em combinação com citotóxicos. Outros ensaios, de fase I e de fase II, estudam os efeitos adversos e a melhor dosagem para o obatoclax quando administrado juntamente com rituximab e bendamustina em doentes com LNH refratário (24, 25).

3.1.2. Via Extrínseca

3.1.2.1. *FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme (FLICE)-inhibitory*

A via extrínseca da apoptose tem uma vasta gama de reguladores. A proteína *FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme (FLICE)-inhibitory* (cFLIP) está entre os mais potentes. A cFLIP é uma proteína celular inibidora da *FADD-like interleukin-1-beta converting enzyme* (FLICE). Trata-se de um homólogo estrutural da caspase-8, que atua como seu inibidor competitivo. A razão de caspase-8/cFLIP, a sua proteína homóloga/inibidora não-funcional, é crítica para a formação do DISC, e subsequente propagação da cascata extrínseca da apoptose (18).

A sobre-expressão da cFLIP tem sido associada a diversas linhas de células hematológicas malignas, incluindo o linfoma de Hodgkin, o LNH de células B e a LLC-B. A inibição da expressão da cFLIP pode ser de particular importância para as terapias do cancro baseadas na indução de uma via apoptótica extrínseca. Os triterpenóides sintéticos têm sido relatados por ativar a apoptose em células de LMA, principalmente através da regulação negativa da cFLIP, com subsequente sensibilização do TRAIL. Além da inibição da cFLIP, os triterpenóides bloqueiam a ativação de NF- κ B e induzem a via apoptótica intrínseca em várias células tumorais (18).

Várias classes de agentes podem regular negativamente a expressão de cFLIP, que tem semelhança estrutural significativa com a caspase-8. É muito difícil atingir a cFLIP diretamente, através de pequenas moléculas capazes de bloquear o recrutamento da cFLIP para o DISC, pois estas podem inibir simultaneamente o recrutamento de caspase-8 e, assim, inibir a apoptose. Para reduzir ou inibir a expressão da c-FLIP são necessárias moléculas pequenas que tenham como alvo cFLIP, sem inibir as caspases 8 e 10. São de particular interesse os compostos que inibem ou regulam negativamente a expressão regular do RNAm da cFLIP ou que causam degradação da cFLIP, ao nível da proteína, através da degradação no proteossoma (26).

Vários inibidores da desacetilação das histonas (HDACi) demonstraram regular negativamente a expressão de cFLIP em várias células cancerígenas ao nível da transcrição e da tradução. Entre estes, o SAHA ou vorinostat, é o HDACi mais promissor, que provoca inibição robusta de variantes cFLIP (26).

3.2. Pró-apoptóticos

3.2.1. Via Intrínseca

3.2.1.1. Família *B-cell lymphoma 2*

A tabela 7 mostra as proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 mais estudadas, tal como, o seu mecanismo de ação e a localização celular.

Tabela 7 - Propriedades de membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 (Adaptado de Tzifi et al, 2012).

	Ação	Mecanismo de ação	Localização Celular
Bax	Pró-apoptótica	Libertação de fatores apoptogénicos como o citocromo c, ativação da cascata das caspases	Citosol
Bak	Pró-apoptótica	Provoca modificações conformacionais para formar agregados durante a apoptose	Proteína integral da membrana mitocondrial
Bid	Pró-apoptótica	Ativador direto da Bax	Citosol e membrana
Bim	Pró-apoptótica	Bim livre liga-se a Bcl-2 ou Bcl-xL e inativa as suas funções anti-apoptóticas	Bim livre na mitocôndria
Bad	Pró-apoptótica	Bad desfosforilada forma um heterodímero com Bcl-2 e Bcl-xL, inativando-as e permitindo a apoptose dirigida a Bax/Bak	Bad livre na mitocôndria

A Bax é uma proteína pró-apoptótica da família Bcl-2, que está no citosol até ser ativada por uma variedade de estímulos de stresse para induzir a morte celular. Proteínas anti-apoptóticas, tais como Bcl-2, podem contrariar a morte celular mediada por Bax. Foi desenvolvido um péptido *Stabilized alpha-helix of Bcl-2 domains* (SAHB) que inicia diretamente a apoptose mitocondrial mediada por Bax. O péptido Bim-SAHB liga-se à Bax num local de interação, que é distinto da fenda de ligação caracterizada por proteínas anti-apoptóticas (Fig.10). A especificidade da interação humana Bim-SAHB-Bax é realçada pelo ponto de mutagénese que interrompe a atividade funcional, confirmando que a ativação Bax é iniciada neste local estrutural. Assim, agora está definido um local de interação Bax para ativação direta, estabelecendo um novo alvo terapêutico para a modulação da apoptose (27).

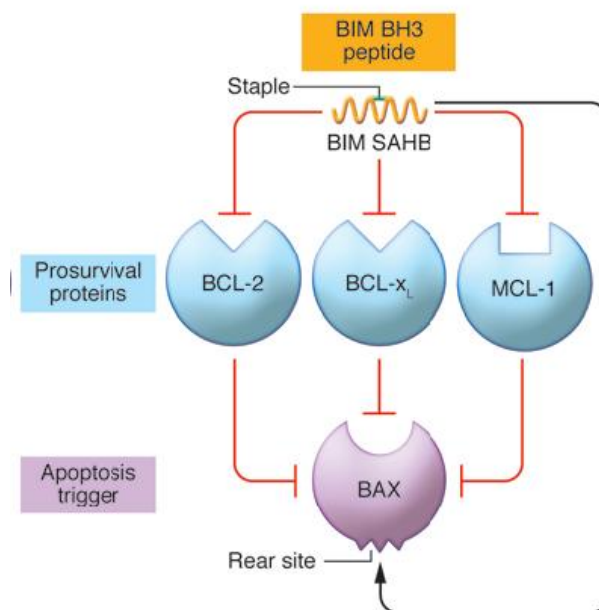


Figura 10 – Terapia farmacológica para reativar a morte celular, em neoplasias hematológicas refratárias, com um péptido estabilizado BIM BH3 (Adaptado de Adams, J. M., 2012).

Foi estudada a ação de BH3-M6 em células cuja sobrevivência depende de proteínas anti-apoptóticas neutralizantes da Bim. A indução da apoptose pelo BH3-M6 depende da sua capacidade para interromper a interação de Bim com a Bcl-xL, Bcl-2, ou Mcl-1. Isto liberta a Bim permitindo que a indução da apoptose se dê, possivelmente, através da ativação de Bax e/ou de Bak. Além disso, a apoptose induzida por BH3-M6 depende da Bax. Os resultados sugerem que a BH3-M6 induz a apoptose, libertando-se a partir de proteínas Bax, anti-apoptóticas e/ou indução de Bax diretamente para assumir a sua conformação pró-apoptótica (28).

A capacidade de BH3-M6 para inibir a ligação da proteína Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1 a proteínas pró-apoptóticas liberta Bax, Bak, Bim e Bad. No entanto, estas proteínas pró-apoptóticas podem ser degradadas pelo proteossoma. Portanto, uma combinação de BH3-M6 com um inibidor do proteossoma parece ser mais eficaz do que o tratamento com o agente único. De facto, existem resultados que o suportam, demonstrando que a combinação de BH3-M6 sinergicamente com o inibidor do proteossoma CEP-1612 mata células cancerígenas. Estes resultados são consistentes com outros que mostram a eficácia da sinergia de ABT-737 com o bortezomib ou inibidores do proteossoma MG-132 (28).

As proteínas BH3 incluem Bim, Bad, Bik, Bid, Noxa, Puma e são membros pró-apoptóticos da família de proteínas Bcl-2. Algumas atuam como iniciadores chave da apoptose por ativação de Bax e Bak através da sua libertação de membros anti-apoptóticos Bcl-2. A Bim, a Bid e a Puma têm sido relatadas por se ligarem diretamente à Bax e Bak e ativarem a sua função pró-apoptótica (29).

Entre os casos de linfoma de células do manto, 17% apresentaram perda da região onde o gene *bim* está localizado. Além disso, o promotor *bim* é metilado em certos tipos de leucemias e linfomas, e esta metilação está associada com baixos níveis de expressão de Bim e resistência a estímulos apoptóticos. Este é o resultado da sobre-expressão das proteínas TC, tais como a proteína de fusão Bcr-Abl na LMC, as duplicações em tandem do recetor FLT3, que ocorrem em 20 a 25% dos casos de LMA, ou a proteína de fusão *Nucleophosmin/Anaplastic lymphoma kinase* (NPM/ALK) no linfoma anaplásico de grandes células. A repressão de Bim mediada por Cinases de c-Jun N-terminais (JNK) tem sido associada à quimiorresistência na LLA-T, enquanto o vírus Epstein-Barr e as oncoproteínas *Epstein-Barr virus nuclear-antigen* (EBNA)3A e EBNA3C estão associadas ao linfoma de Burkitt (29, 30).

Tem sido demonstrado que a Bim é fundamental para a apoptose induzida por vários agentes quimioterapêuticos. O bloqueio da sinalização de Bcr-Abl por inibidores de tirosina-cinase (ITC), tais como o imatinib, o nilotinib (INNO-406) ou o 17-AAG, (um inibidor de proteína de choque térmico HSP-90), induz a Bim em células cancerígenas Bcr-Abl-positivas. Também foi observada a cooperação entre Bim e Bad durante a apoptose induzida por dexametasona em conjunto com o inibidor de fosfatidil-inositol 3-cinase (PI3K) LY294002 no linfoma folicular. Para além disso, a cooperação de Bim e Noxa foi detetada na apoptose induzida por seliciclib na LLC-B. A Bim é também crucial para a apoptose pelo sorafenib em LMA (29).

3.2.2. Via Extrínseca

3.2.2.1 Fator de necrose tumoral alfa

O FNT- α está implicado em vários processos fisiológicos (proliferação, diferenciação, apoptose), tal como condições fisiopatológicas (choque séptico, carcinogénese, necrose, caquexia, febre hemorrágica). O FNT- α é produzido principalmente por monócitos/macrófagos ativados e linfócitos (18).

O principal recetor pró-apoptótico de FNT- α é o recetor do fator de necrose tumoral alfa (RFNT)1, embora a ativação de RFNT2 possa, sob certas consequências provocar a morte celular independente das caspases. Além de desencadear a apoptose, o FNT- α é um indutor potente de várias vias de sinalização importantes, incluindo as vias de *mitogen activated protein kinase* (MAPK), JNK, NF- κ B ou fosfatidil-inositol 3-cinase/proteína cinase B (PI3K-AKT/PKB) (18).

O FNT- α pertence a moléculas com efeitos anti-tumorais potentes *in vitro* e *in vivo*. Contudo, na leucemia, o FNT- α pode induzir apoptose ou proliferação, dependendo do fenótipo da célula e proporção de recetores de FNT- α (18).

Vários agentes, tais como a briostatina têm a capacidade de induzir o FNT- α , ativando assim a cascata do recetor de FNT- α e estão a ser testados em ensaios clínicos (31).

3.2.2.2 Ligando do Fas

A via extrínseca é dependente da interação de recetores de morte celular, como a ligação do recetor Fas com seu ligando (FasL) daí a sua importância e influência na terapêutica das doenças. A deficiência e a exacerbação do sistema Fas-FasL já foram associadas ao aparecimento de tumores, doenças autoimunes e destruição tecidual. A expressão diminuída de Fas e aumentada de FasL nas células de leucemia, podem aumentar a sua sobrevivência tornando-as resistentes à apoptose. O descontrolo do processo de apoptose devido à exacerbação parece estar relacionado com a patogénese de algumas doenças hematológicas, como as NMD e a anemia aplásica grave. A deficiência já foi associada com a LMC e com leucemias linfóides (2).

O Fas-L e o seu recetor Fas são expressos em linfócitos T ativados e células NK. As células neoplásicas que expressam o Fas tendem a ser suscetíveis à apoptose induzida por Fas-L. Contudo, a resistência à apoptose induzida por Fas-L não é rara. Muitas neoplasias hematológicas têm mostrado expressar o Fas-L e induzir a morte de células que expressam Fas dos tecidos do hospedeiro, incluindo as células imunocompetentes. Isto pode contribuir tanto para a invasão tumoral como para os efeitos secundários tóxicos associados à progressão do tumor. O aumento da expressão de Fas-L e Fas em progenitores hematopoiéticos pode contribuir para a eritropoiese ineficiente em NMD (18).

A expressão simultânea do recetor Fas e do seu ligando Fas-L em linfócitos maduros, ativados por células neoplásicas, pode representar um mecanismo de autolimitação da resposta imunitária. O Fas e a proteína Bcl-2 que estão expressos de maneira equilibrada nos leucócitos normais, nas leucemias, estão alterados (2).

A expressão da proteína Bcl-2 parece aumentar com a progressão da doença, o que reforça a hipótese de que, quando expressa em níveis altos, prolongaria a sobrevivência das células neoplásicas, tornando-as resistentes à apoptose. O Fas, por sua vez, parece estar expresso em níveis normais ou diminuídos nas células mononucleares na LMC, o que conferiria maior resistência dessas células à apoptose, bem como aos fármacos quimio e imunoterápicos (2).

3.2.2.3 Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

O TRAIL é uma citocina pró-apoptótica implicada na vigilância da célula cancerígena. O TRAIL é um potente indutor da apoptose de várias linhas celulares transformadas. É capaz de induzir a regressão de tumores em modelos animais, incluindo doenças mielo e linfoproliferativas. À semelhança do Fas-L, o TRAIL está implicado no combate efetuado pelas células NK e T citotóxicas, contra células transformadas (18, 32).

Têm sido descritos cinco recetores diferentes para o TRAIL. Contudo, apenas TRAIL-R1 (DR4) e TRAIL-R2 (DR5), são recetores agonistas de TRAIL, que contêm um domínio de morte citoplasmático, o que lhes permite iniciar logo a apoptose da célula. Após a ligação do TRAIL, os recetores de morte (DR4, DR5) iniciam o processo de apoptose. Os *death decoy receptor* (DcR)1 e DcR2 são incapazes de transdução de sinais de morte, e as suas atividades parecem ser principalmente anti-apoptóticas. A Osteoprotegerina (OPG), um ligando solúvel de baixa afinidade para TRAIL, neutraliza todas as suas atividades (18, 19).

Muitos mecanismos moleculares potenciais de resistência à apoptose induzida por TRAIL, em células tumorais, foram relatados até ao momento. O aumento da expressão de recetores “decoy” (DcR1 e DcR2) tem sido correlacionado com a resistência ao TRAIL em LMA e LMC (18).

A resistência adquirida de uma linha de células (HL60) para TRAIL foi associada com a resistência cruzada ao Fas-L, um outro ligando de morte da família FNT. Existem dados que sugerem que a resistência adquirida ao TRAIL pode envolver mecanismos reguladores comuns, incluindo outros membros da família de recetores de FNT. Como consequência, a resistência adquirida a TRAIL de tumores, após tratamento com TRAIL, pode estar associada com a resistência a outros membros da família de ligandos de morte, FNT- α e Fas-L, sugerindo uma maior capacidade das células tumorais para escapar à vigilância imunitária do tumor e às respostas imunes anti-tumorais (32).

A resistência das células tumorais para TRAIL foi relatada como associada com a desregulamentação de diversas moléculas de sinalização incluindo recetores-TRAIL,

caspase-8, c-FLIP, e vários reguladores de apoptose, incluindo proteínas das famílias Bcl-2, IAP e das proteínas de choque térmico (HSP) (32).

Em células HL60, a resistência ao TRAIL foi recentemente atribuída à mutação da caspase-8. Vários estudos mostraram a mutação na caspase-8 e a sua degradação acelerada como um mecanismo de resistência de TRAIL em vários tipos de células tumorais. O papel da caspase-10 na mediação da apoptose induzida por TRAIL na leucemia permanece pouco conhecido. Contudo, a inibição de qualquer uma das caspases-8 ou 10 conduziram à apoptose induzida por FNT- α de células HL60 *wild type* (WT) sensíveis a TRAIL. Ambas as caspases 8 e 10 têm um papel importante na apoptose mediada por recetores de morte nas células HL60 (32).

Em determinados tipos de linfomas e leucemias, a expressão de TRAIL e/ou dos seus recetores de morte pode ser induzida por radiações, citostáticos, inibidores do proteossoma, anti-metabolitos e muitos outros agentes. Por outro lado, linfomas e leucemias resistentes foram sensibilizados para a irradiação ou para a apoptose induzida por quimioterapia, após incubação com TRAIL (18).

O TRAIL recombinante e solúvel desencadeia a apoptose em várias linhas celulares de cancro, incluindo neoplasias hematológicas. Uma estratégia terapêutica alternativa baseia-se no uso de anticorpos monoclonais dirigidos especificamente para o recetor agonista TRAIL-R1 (DR4) ou TRAIL-R2 (DR5). Os agentes alvo do recetor TRAIL-R1, em combinação com os HDACi demonstraram desencadear a apoptose em LLC e em linfoma de células do manto (19).

Os resultados de um ensaio clínico de fase II demonstraram que HGS-ETR1 (mapatumumab), um anticorpo monoclonal totalmente humano contra TRAIL-R1 é bem tolerado e capaz de produzir respostas clínicas em 8% dos doentes quando administrado em monoterapia em doentes com LNH avançado. Noutro ensaio clínico de fase I, usando um anticorpo monoclonal totalmente humano para TRAIL-R2 (HGS-ETR2), um doente com doença de Hodgkin refratária à quimioterapia teve uma regressão do tumor. Os anticorpos monoclonais anti-DR4 (mapatumumab) e anti-DR5 (lexatumumab) estão em ensaios clínicos de fase I e de fase II, respetivamente, para várias neoplasias, incluindo doenças linfoproliferativas. Além disso, o TRAIL humano recombinante está atualmente sob investigação em ensaios de fase I, em combinação com rituximab, em doentes com LNH de baixo grau (18, 19).

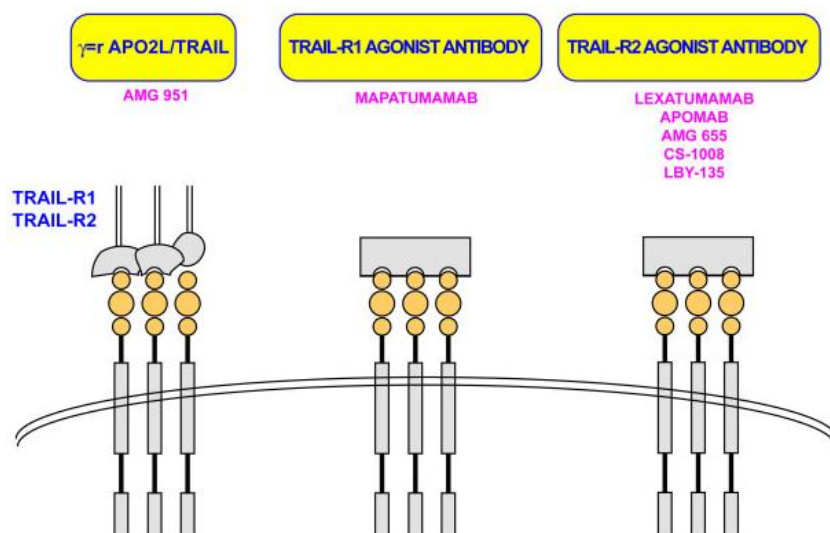


Figura 11 – Fármacos pró-apoptóticos agonistas de TRAIL-R1 e TRAIL-R2. À esquerda um ligando TRAIL humano recombinante, ao centro e à direita os anticorpos monoclonais agonistas que são seletivamente específicos para cada recetor, TRAIL-R1 ou TRAIL-R2 (Retirado de Testa, U., 2010).

A grande maioria das neoplasias hematológicas é resistente à apoptose mediada por TRAIL, basicamente devido à ativação da via de sinalização anti-apoptótica (como NF-κB), a sobre-expressão de proteínas anti-apoptóticas (como a cFLIP, a Bcl-2 e a XIAP) ou expressão reduzida de TRAIL-R1/R2. Têm sido desenvolvidas estratégias para ultrapassar esta resistência, que se baseiam na combinação de TRAIL com quimioterapia ou radioterapia, ou com HDACi (como SAHA), inibidores do proteossoma (bortezomib) ou inibidores do NF-κB (32, 33).

3.3. Outros alvos regulatórios da Apoptose

3.3.1. *Chaperones moleculares*

A família das HSP inclui as proteínas pró-apoptóticas e as anti-apoptóticas. A sobre-expressão das subfamílias HSP27, HSP70, HSP90 tem sido implicada na proteção de várias células cancerígenas contra a apoptose induzida por fármacos. A inibição terapêutica induzida pela expressão ou atividade de HSP e o uso dos seus inibidores surgiu recentemente como nova estratégia terapêutica em protocolos anticancerígenos (18, 34).

O tratamento de LMC com inibidores de HSP90, herbimicina A (HMA), benzoquinona ansamicina geldanamicina (GA) ou o seu derivado 17-AAG levaram à destruição rápida dos clones positivos de Bcr-Abl. Além disso, as células de LMC, que desenvolveram resistência ao mesilato de imatinib, ainda permanecem suscetíveis a inibidores de proteínas de choque térmico (HSPI). Além dos resultados animadores obtidos em células de LMC, estão a decorrer vários ensaios clínicos para inibidores da HSP90 (como o 17-AAG, e o seu análogo solúvel em água, o 17 DMAG) em diversas neoplasias hematológicas, quer como agente único quer em combinação com outros fármacos citostáticos, tais como o bortezomib, a citarabina e o imatinib (18, 34).

A utilização de HSP90, como alvo da terapêutica, tem mostrado eficácia no controlo da apoptose de células de neoplasias hematopoiéticas. No linfoma de células do manto o inibidor de HSP90 (17-AAG) induz a paragem do ciclo celular e a apoptose por ativação da caspase-9. Nas leucemias de células-T associadas ao vírus T-lymfotrópico humano (HTLV)1 no adulto, a inibição de HSP90 anula a progressão do ciclo celular e induz a apoptose através da inibição da via do NF-kB. Da mesma forma, a administração oral do inibidor de HSP90 (CNF2024) inibiu a viabilidade celular do linfoma de Hodgkin, em baixas concentrações (nanomolares), pela inibição da atividade de NF-kB. Além disso, este composto pode sensibilizar as células do linfoma de Hodgkin para a morte mediada pelas células NK. No LDGCB, usando um inibidor de HSP90 da classe das purinas, o PU-H71, a apoptose foi observada nas células B. Este fármaco está relacionado com uma boa tolerância *in vivo* (34).

Alguns agentes inibidores de HSP90 encontram-se em ensaios clínicos e constam na tabela 8, juntamente com a classe química a que pertencem.

Tabela 8 – Inibidores HSP90 em ensaios clínicos (Adaptado de Mjahed et al, 2012).

HSP90 inhibitors	Chemical class	Current status
17-DMAG	GA-derivative	Phase I
17-AAG		Phase III
IPI-493		Phase I
IPI-504		Phase III
KW-2478		Phase I
AT13387	Resorcinol	Phase I
TAT		
Polyarginine	PTD	AML, APL, DLBCL
Hydrocarbon-stapled		Myeloma
LBH589		LCL
SAHA	HDAC	CML, AML
CNF2024/BIIB021		Phase II
MPC-3100	purine-scaffold	Phase I
PU-H71		Phase II
NVP-AUY922 (VER-52269)		
DS-2248	isoxazole-derivative	
STA-9090 (Ganetespib)	Not reported	Phase I
	Triazole-derivative	Phase II

Devido às suas propriedades anti-apoptóticas e tumorigênicas, as HSPs são alvos interessantes da terapia do cancro. O recetor tirosina-cinase FLT3 envolvido na patogénese da LMA e as proteínas quiméricas Bcr-Abl e NPM-ALK, envolvidas na LMC e linfomas de grandes células anaplásicas, respetivamente, são as proteínas chave para as HSP90. Os agentes inibidores HSP90, atualmente em investigação clínica, em várias neoplasias hematológicas, são medicamentos promissores nestas doenças. Alguns destes compostos (inibidores HSP90 derivados da GA) estão em ensaios clínicos de fase II/III, para diferentes neoplasias hematopoiéticas (34).

Foi demonstrado que o alvo de HSP70 derivado do fator indutor de apoptose (AIF), chamado *AIF derived decoy for HSP70* (ADD70), pode sensibilizar as células cancerígenas para a indução de apoptose, pela neutralização da função da HSP70. O restabelecimento da localização nuclear de HSP70 pode resgatar o processo de diferenciação eritroide nas NMD. Além disso, uma vez que o evento chave para diferenciar os eritroblastos não é o conteúdo de HSP70, mas a sua localização nuclear, a expressão nuclear de HSP70 pode ser um biomarcador para a atividade do fármaco imunomodulador lenalidomida e, também, de agentes desmetilantes atualmente

utilizados no tratamento de NMD, tais como a azacitidina (Vidaza) e decitabina (34, 35).

Vários estudos recentes estabeleceram o uso de agentes hipometilantes como a azacitidina e decitabina como terapia padrão para o tratamento de NMD. Deste modo, a azacitidina foi o primeiro agente aprovado para o tratamento de NMD que está associado ao prolongamento da sobrevivência e, por isso, causou uma mudança no curso natural destas neoplasias. As NMD são encontradas, tipicamente, em doentes de idade avançada, com comorbilidades, o que faz com que esta terapêutica esteja disponível apenas para uma proporção muito reduzida de doentes. Novos fármacos estão em desenvolvimento em combinação com hipometilantes com o objetivo de aumentar a eficácia destes últimos quando administrados como agentes isolados (35).

O oligonucleotídeo anti-sense OGX-427, é o único inibidor específico de HSP27 conhecido, que pode ser administrado com segurança em doentes e está em ensaios clínicos de fase II (34).

3.3.2. Via fosfatidil-inositol 3-cinase/ proteína cinase B

A ativação anormal da cascata fosfatidil-inositol 3-cinase/ proteína cinase B – alvo da rapamicina em mamíferos (PI3K-AKT/PKB-mTOR) representa um dos principais fatores determinantes da resistência à apoptose em células cancerígenas. Proporciona, assim, o desenvolvimento de novas abordagens anti-neoplásicas que utilizam agentes terapêuticos dirigidos à inibição de componentes essenciais desta via de sinalização pró-sobrevivência. Outra abordagem na tentativa de parar esta via é o alvo, bem definido a jusante de PI3K, a cinase serina/treonina AKT/PKB. Os inibidores de AKT à base de lípidos, como perifosina e miltefosina demonstraram eficácia e boa tolerância em estudos clínicos precoces (18).

A via PI3K/AKT/mTOR está intimamente relacionada com a MAPK e é uma via intracelular intensamente explorada na gênese de neoplasias. Descobrir alterações na via PI3K/AKT/mTOR e os seus papéis na gênese de neoplasias permitiu o desenvolvimento de novas moléculas alvo com potencial para o tratamento anti-neoplásico eficaz. A ativação anormal desta via, em vários níveis de sinalização, é frequentemente observada em muitas neoplasias humanas (36).

O primeiro inibidor de mTOR isolado, a rapamicina, foi originalmente aprovado como um fármaco imunossupressor para a profilaxia da rejeição de transplantes de órgãos. Foram desenvolvidos derivados da rapamicina que se caracterizam pela sua estabilidade e solubilidade superior à da rapamicina, tais como o RAD001 (everolimus), o CCI-779 (temsirolimus). Até ao momento, surgiram alguns fármacos análogos da rapamicina, como estes inibidores do complexo mTOR1 (mTORC1). Estes foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), a partir de ensaios clínicos, para o tratamento de diversos tumores sólidos e hematológicos (18, 36, 37).

O mTOR é um componente chave a jusante das cascatas de sinalização PI3K e AKT. Considerando a frequência elevada da desregulação destas vias no contexto das neoplasias, o mTOR emergiu como um alvo importante para a terapêutica inibidora. Novos agentes dirigidos simultaneamente ao mTORC2 ou à AKT em conjunto com o mTORC1 podem ser uma oportunidade para melhorar a eficácia da terapêutica (37).

Os sítios catalíticos de PI3K e mTOR partilham um elevado grau de homologia. Em modelos pré-clínicos, os inibidores duplos PI3K/mTOR exibem uma citotoxicidade muito mais forte contra as células de leucemia aguda do que, individualmente, os inibidores de PI3K ou inibidores de mTOR (tais como a rapamicina). Estes, reduziram fortemente a proliferação celular e induziram uma importante resposta apoptótica (38).

A regulação positiva da sinalização PI3K/AKT/mTOR é muito comum na LLA-T, sendo detetável em 70-85% dos doentes, e indica um prognóstico pior. Da mesma forma que na LMA, múltiplos mecanismos podem levar ao aumento da atividade PI3K/AKT/mTOR em células de LLA-T (38).

Têm sido desenvolvidos inibidores do mTOR de segunda geração que bloqueiam ambos mTOR1 e mTOR2. Ao contrário dos análogos da rapamicina, estes inibidores não estão associados ao aumento da atividade de PI3K e por isso podem ter um grande potencial como anti-neoplásicos. Uma alternativa para superar a resistência à inibição de mTOR é dirigir a atividade para ambos os alvos mTOR e PI3K. Estes compostos como o NVP-BEZ235 (da Novartis) têm a capacidade de inibir a tradução das proteínas através da inibição da sinalização de PI3K e mTORC1 e também a atividade de mTORC2 (37).

Alguns estudos têm destacado que o PI-103, um inibidor PI3K/mTOR, pode ter valor terapêutico em leucemias agudas. A eficácia de PI-103 tem sido documentada, tanto *in vitro* como *in vivo*, em células de LLA-B Ph⁺. Com efeito, o fármaco foi mais

eficaz do que a rapamicina a suprimir a proliferação de LLA-B Ph⁺, no rato, co-tratado com o ITC, o imatinib. No caso de LLA-B Ph⁺, a presença de PI-103 combinado com imatinib suprimiu a formação de colónias numa maior extensão do que o imatinib sozinho ou este em combinação com a rapamicina (38).

Foi documentada a sinergia de PI-103 com trióxido de arsénico (As₂O₃), na leucemia promielocítica não aguda (não-LPA). Como o As₂O₃ ativa transitoriamente a sinalização PI3K/AKT/mTOR em blastos na não-LPA, este aumento poderia ser bloqueado por PI-103. A combinação de As₂O₃/PI-103 foi pouco tóxica para as células estaminais hematopoiéticas (CEH) da medula óssea saudável. Apesar da terapia diferencial com As₂O₃ ser muito bem-sucedida em casos de LPA, os casos de não-LPA não respondem (38).

Uma das novas estratégias anti-neoplásicas mais eficazes requer a dupla inibição das vias de sinalização PI3K e mTORC1. Suportando esta hipótese, este novo inibidor competitivo PI3K/mTOR, o NVP-BEZ235, demonstrou atividade potente em células de LMA em estudos pré-clínicos (37).

O NVP-BEZ235 é um fármaco oralmente biodisponível, que entrou em ensaios clínicos de fase I/II para tumores sólidos. A sua eficácia foi testada em linhas de células humanas de LMA ao inibir PI3K, mTORC1 e mTORC2. O NVP-BEZ235 reduziu a proliferação e induziu uma importante resposta de apoptose em células de LMA. Além disso, afetou a atividade da leucemia sem afetar as células de sobrevivência saudáveis CD34⁺. O NVP-BEZ235 foi citotóxico para um painel de linhas celulares LLA-T e causou paragem do ciclo celular, apoptose e autofagia. Pode ser utilizado em sinergia com vários agentes quimioterápicos (ciclofosfamida, citarabina, dexametasona) usados atualmente para o tratamento de doentes com LLA-T (38).

3.3.3. Cascata janus cinase/transdutores de sinais e ativadores de transcrição

Os membros da proteína tirosina-cinase janus cinase (JAK1, 2, 3, e TYK2) são componentes cruciais de diversas vias de transdução de sinal que regulam a sobrevivência celular, a proliferação, a diferenciação e a apoptose. A ligação de citocinas aos recetores de superfície celular resulta na oligomerização do recetor com subsequente ativação de moléculas de Janus cinase (JAK). As JAK ativadas fosforilam domínios citoplasmáticos dos recetores agregados criando assim sítios de ancoragem para proteínas chamadas transdutores de sinais e ativadores de transcrição (STAT: STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b e 6) (18).

Uma vez ligadas aos recetores de citocinas, as STAT são fosforiladas por JAK, formam homo e heterodímeros, e são translocadas para o núcleo, onde se inicia a transcrição de diversos genes alvo. As vias JAK-STAT são controladas por, pelo menos, três classes de reguladores negativos. Estes incluem supressores de sinalização de citocinas, proteínas tirosina fosfatases e inibidores da proteína de STAT ativadas. Um certo número de doenças, incluindo neoplasias hematológicas, está associado com a desregulação das vias de sinalização JAK-STAT (18).

As STATs foram encontradas constitutivamente activadas numa grande variedade de neoplasias hematológicas mielóides e linfóides. As STAT1, 3, 5 e 6 ativadas foram detetadas em leucemias agudas e crónicas, LNH de células B, Linfoma de Burkitt, vários tipos de linfoma cutâneo, em células de Reed-Sternberg de doentes com linfoma de Hodgkin e MM, entre outras (18).

A inibição da expressão de STAT por oligonucleotídeos anti-sense constitui outro caminho possível para o bloqueio terapêutico de sinalização JAK-STAT em tumores. O tyrphostin (AG490, inibidor de JAK2), o resveratrol (inibidor de STAT3) e o piceatannol (inibidor de STAT3) têm sido relatados por sensibilizar linhas de células de LNH e MM para uma bateria de fármacos quimioterapêuticos (18).

Estudos recentes sugerem que a ativação frequente da sinalização STAT3 fornece vantagem de sobrevivência para células de MM, e que a STAT3 pode servir como um novo alvo para o tratamento de neoplasias hematológicas, incluindo o MM. Os efeitos inibidores da cladribina em linhas celulares de MM (U266, RPMI8226, MM1.S), e o seu potencial terapêutico em combinação com um inibidor específico da STAT3 foram estudados (39).

A cladribina é um nucleosídeo análogo das purinas, com atividade em neoplasias linfoproliferativas, tais como na tricoleucemia. A resistência à cladribina pode ser atribuída, em parte, a uma via de sinalização STAT3 hiperativa, o que frequentemente ocorre no MM. A cladribina em combinação com o S3I-201, um inibidor específico da STAT3, resultou em apoptose significativa nas três linhas celulares de MM, em comparação com qualquer dos agentes isolados. A cladribina induziu a inibição do crescimento e apoptose, em células de MM, correlacionadas com a sua capacidade para inativar a STAT3 (39).

Ao nível molecular, a cladribina induziu clivagem de PARP e ativação da caspase-8 e da caspase-3. O tratamento com cladribina levou a uma redução notável do STAT3 fosforilado (P-STAT3), mas teve pouco efeito sobre os níveis de proteína não fosforilada. A combinação de cladribina com um inibidor específico da STAT3, em comparação com qualquer dos agentes por si só, induziu apoptose significativa em todas as linhas celulares de MM estudadas (39).

Há estudos que sugerem que a cladribina, em combinação com inibidores da STAT3, pode ser mais promissora para os doentes por exercer um potencial terapêutico mais amplo contra o MM (39).

A sinalização JAK2 é fundamental na hematopoiese normal. A mutação recorrente, JAK2 V617F está associada a NMP. Têm sido sugeridos vários modelos de mecanismos para explicar a persistência da inibição de JAK2 em NMP. Essa inibição está associada com a reativação da sinalização JAK/STAT e com a heterodimerização de JAK2 com JAK1 ou TYK2. É um processo reversível, onde os inibidores JAK2 estão associados com a sensibilização à inibição de JAK2 (40).

No tratamento com ruxolitinib, o inibidor JAK1/2, reduziu a hiperforilação do alvo STAT5 a jusante de JAK2. Recentemente, o ruxolitinib foi aprovado pela FDA para o tratamento da mielofibrose (MF) de risco intermédio ou alto, com base nos resultados dos ensaios CONFORT-I e CONFORT-II. Os resultados do estudo COMFORT-I parecem sugerir que ruxolitinib, o primeiro agente aprovado para o tratamento de MF, pode prolongar a sobrevivência em comparação com a terapia disponível, alterando a história natural da doença oncológica (40).

O SAR302503 é um inibidor seletivo da JAK2 com atividade limitada contra JAK 1. Num estudo de fase I, 86% dos doentes com MF eram positivos para a mutação JAK2 V617F. Um estudo de fase III com SAR302503 está em curso para doentes com

MF. Espera-se confirmar os benefícios clínicos observados com ruxolitinib e outros inibidores da JAK2 (40).

Dadas as limitações do tratamento com um único agente inibidor da JAK2, estão a ser desenvolvidas várias combinações. Vários estudos pré-clínicos demonstraram melhor eficácia nas NMP com as combinações das inibições da JAK2 e das HDAC. A aplicação de HDACi em NMP é suportada por dados que mostram que a JAK2 (quer de tipo selvagem quer mutante) é translocada para o núcleo e modifica as histonas. Os HDACi demonstraram induzir a inibição do ciclo celular, paragem do crescimento e apoptose de CEH. Um HDACi, o panobinostat, inibiu eficazmente a expressão e sinalização de JAK2 V617F e induziu apoptose no rato e nas CEH humanas que expressam JAK2 V617F. Um inibidor JAK2, o TG101209, impediu a sinalização a jusante de JAK2 V617F e induziu a apoptose também. Quando utilizados em combinação, tiveram um efeito sinérgico na indução de apoptose no rato e nas CEH humanas que expressam JAK2 V617F. O panobinostat e o TG101209, juntos, também induziram uma maior perda de viabilidade de células CD34⁺ de NMP em comparação com o normal das CEH CD34⁺ (40).

Existem ensaios de fase II com HDACi cujos resultados indicam a sua potencial utilidade em doentes com NMP. A terapia de ruxolitinib em combinação com panobinostat mostrou que estes dois compostos parecem conferir eficácia complementar e não sobreposta nas NMP (40).

3.3.4. *Recetores tirosina cinase.*

A ativação aberrante de um recetor tirosina cinase (RTC) resulta na sinalização de várias cascatas pró-sobrevivência importantes, incluindo as vias RAS-RAF-*mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase* (MEK), MEK- *Extracellular signal-regulated kinase* (ERK) ou PI3K/AKT/mTOR, que contribuem para o aumento da proliferação, crescimento acelerado e suscetibilidade enfraquecida para estímulos apoptóticos de células de leucemia. O FLT3, um RTC classe III, é o gene mais frequentemente mutado na LMA, enquanto mutações no c- kit estão fortemente ligadas ao desenvolvimento de neoplasias dos mastócitos (18, 41).

A frequência de ganho de função das mutações RAS em neoplasias hematológicas varia de 5% a 15 % em LLA e até 65% em leucemia mielomonocítica crónica (LMMC). As mutações RAS são um achado comum no MM, bem como em doentes com NMD (18).

A desregulação da sinalização Ras é prevalente em praticamente todos os tumores humanos e é conseguida principalmente através de dois mecanismos. Primeiro, as proteínas Ras tornam-se aberrantes pela ativação constitutiva de proteínas TC a montante de Ras, tais como recetores de citocinas com atividade de tirosina-cinase e Bcr–Abl. No segundo mecanismo, as mutações adquiridas no oncogene Ras desfazem a atividade GTPase da Ras. São detetadas mutações oncogénicas em três genes Ras (Hras, Nras e Kras) em praticamente todos os tipos de tumores humanos com diferentes incidências e associações específicas com genes Ras. As mutações no gene Ras são prevalentes em 20-40% de NM (30).

Os bisfosfonatos aminados (N-BP) induzem a apoptose através da diminuição do potencial transmembranar mitocondrial, o aumento da ativação da caspase-9 e caspase-3 e aumentando a expressão de Bim através da inibição das vias Ras/MEK/ERK e Ras/mTOR (30).

As vias de sinalização aberrantemente ativadas pela proteína quimérica tirosina-cinase Bcr-Abl são muito semelhantes ao das vias de sinalização ativadas por RTC. O primeiro agente terapêutico das novas moléculas alvo de terapia já introduzidos no uso clínico foi o ITC, mesilato de imatinib (Gleevec, Glivec). Na LMC, o imatinib atua essencialmente através de interação com a proteína quimérica da tirosina-cinase Bcr-Abl, que bloqueia diferentes vias de sinalização celular, que estavam ativadas por esta

proteína. Além do imatinib, outros inibidores de pequenas moléculas de proteína tirosina-cinases, tais como o dasatinib (BMS- 354825, Sprycel) e o nilotinib (AMN-107), têm sido muito promissores em doentes com LMC resistentes ao mesilato de imatinib (2, 18).

Num estudo em que a principal questão foi se a história de sucesso do imatinib na LMC, poderia ser imitada na MS o imatinib foi o primeiro ITC avaliado *in vitro*, uma vez que revolucionou o tratamento da LMC. O imatinib mostrou ser muito eficaz em doentes com neoplasias mielóides com eosinofilia associada com genes de fusão FIP1L1/PDGFR ou *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR)B ou com NMP. Embora alguns destes doentes possam ter associada proliferação de mastócitos, eles são melhor classificados pela OMS com uma neoplasia mielóide com eosinofilia e rearranjo de PDGFR (41).

O dasatinib, um ITC com uma semi-vida muito curta *in vivo*, diminui a sobrevivência e proliferação de células humanas neoplásicas e normais ao afetar os recetores de cinase, inibindo vias de sobrevivência (por exemplo, JAK/STAT, RAS), e causando paragem do ciclo celular. A semi-vida de dasatinib é curta (3-5 horas), o que pode não ser suficiente em doentes com neoplasia de mastócitos avançada com expressão KIT mutante, em oposição às células de LMC dependente de Bcr-Abl, que rapidamente sofrem apoptose após uma breve exposição ao fármaco. O nilotinib é um ITC com um perfil semelhante ao imatinib. É indicado na fase crónica de doentes com LMC, bem como na fase crónica ou acelerada de LMC que são resistentes ou intolerantes ao imatinib (41).

Na maioria dos doentes com MS com mutação KIT D816V, o imatinib é ineficaz. Os ITC como o dasatinib e o nilotinib, aprovados para outras indicações, também não produziram resultados favoráveis em ensaios clínicos em doentes com essa mutação. Esta falha pode ser devida a vários fatores, tais como mutações no codão 816 que interferem com a interação do recetor do fármaco (imatinib), ou o potencial para aumentar os efeitos adversos devido a múltiplos alvos cinase ou a curta semi-vida (no caso do dasatinib). Além disso, os mastócitos neoplásicos também podem contar com outras vias independentes de kit para a sobrevivência. Novos ITC estão a ser avaliados e podem oferecer possíveis tratamentos futuros (41).

O sorafenib (Nexavar) é um inibidor multicinase. Ao nível molecular, para além da via da cinase RAF, que representou o primeiro alvo terapêutico do sorafenib, foram identificadas cinases adicionais como alvos importantes deste fármaco. Um grande

interesse para o uso potencial do sorafenib na LMA surgiu quando se demonstrou que uma mutação específica de um gene cinase, chamado *FMS-like tyrosin-kinase-3-internal tandem duplication* (FLT-3-ITD), que ocorre em mais do que 30% das LMA, representa um alvo molecular do sorafenib. Outro alvo do sorafenib é a proteína anti-apoptótica Mcl-1. O efeito pró-apoptótico do sorafenib não está restrito às células no ciclo celular, mas também é mantido na proliferação de células de LLC. O sorafenib induz a apoptose em células primárias de LLC, tem um forte efeito pró-apoptótico. A sua capacidade de inativação rápida de Mcl-1, em praticamente todas as neoplasias hematopoiéticas investigadas, incluindo a LLC-B, representa um elemento-chave para a sua atividade, bem como para terapêuticas baseados em combinações. O sorafenib, pode superar a resistência a fármacos em LLC, e pode ser uma nova opção terapêutica para doentes que tiveram uma recaída após imunoquimioterapia (42, 43).

3.3.5. Proteína cinase C

As proteínas cinases C (PKC) são uma família de cinases serina/treonina dependentes de fosfolípidos. As PKC convencionais (as isoformas alfa, beta I, beta II e gama) requerem Ca^{2+} , diacilglicerol (DAG), e um fosfolípido para a ativação. As novas PKC (isoformas delta, epsilon, eta e teta) requerem DAG, mas não necessitam de Ca^{2+} para a ativação. A PKC tem um papel importante na carcinogênese e progressão de neoplasias. As PKC-alfa e beta têm sido associadas a um aumento da invasão, à proliferação, à resistência aos fármacos e à instabilidade genética, enquanto se pensa que a PKC-delta exerce a sua ação ao aumentar a apoptose (18).

A PKC412 inibe potentemente o crescimento das linhas de células de LLC-B. A inibição de PKC oferece uma nova abordagem para a quimioterapia de leucemias agudas e neoplasias de células B. A enzastaurina (LY317615) suprime a sinalização através das vias PKC e PI3K-AKT/PKB-mTOR, o que resulta na diminuição da proliferação, na indução da apoptose e inibição da angiogênese, em muitos tumores sólidos e neoplasias hematológicas (18).

A PKC-delta, uma isoforma da PKC independente do Ca^{2+} , desempenha um papel central na resposta ao stresse genotóxico, levando à indução de apoptose em células expostas a agentes que danificam o *DNA*. Além disso, a PKC-delta é um ativador potente de NF-kB e ciclina D1, dois dos principais alvos para várias vias de

sinalização de crescimento estimuladores e fosforila o supressor de tumor p53, o que leva a sua ubiquitinação e subsequente degradação pelo proteossoma. O bloqueio de PKC-delta constitutivamente ativada pelo seu inibidor específico Rottlerin demonstrou ser eficaz em provocar a apoptose numa variedade de células de LLC-B (18).

A briostatina-1, um ativador PKC-delta, induziu diferenciação de células de LLC e exerceu atividade anticancerígena *in vivo*. Demonstrou ser capaz de induzir apoptose em células de LMA humanas. Ensaios clínicos de fase I e II têm demonstrado o potencial da briostatina-1 como agente terapêutico para leucemias refratárias e neoplasias hematopoiéticas indolentes. Alguns investigadores, focados no mecanismo exclusivo da briostatina-1 em ativar PKC-delta, que desempenha um papel supressor de tumor, descobriram um análogo simples e menos lipofílico (aplog-1) que apresentou comportamento de ativação de PKC-delta semelhante à briostatina-1 e foi facilmente sintetizado (18, 44).

3.3.6. Fator nuclear κB

A perda da regulação normal do NF- κB está associada com o crescimento acelerado, a resistência à apoptose, e a propensão para formar metástases. A atividade nuclear constitutiva de NF- κB foi detetada em grande número de neoplasias hematológicas e tumores sólidos, incluindo o MM, o linfoma de Hodgkin, a LLC-B e diversos subtipos de LNH (18).

Algumas mutações no gene *inhibitor of NF- κB* (I- κB) foram referidas por processar NF- κB constitutivamente ativo em células de linfoma de Hodgkin (18).

A inibição da *I- κB kinase* (IKK)-beta representa uma abordagem alternativa ao alvo NF- κB constitutivamente ativo no MM e noutras neoplasias hematológicas. Os triterpenóides sintéticos têm emergido como um novo grupo de agentes anti-tumorais experimentais com propriedades distintas de inibição de NF- κB (18).

Os fármacos que inibem simultaneamente várias vias de sobrevivência têm sido relatados por inibir também NF- κB ou a sua translocação para o núcleo. O resveratrol tem mostrado promover a apoptose através do bloqueio da expressão de proteínas anti-apoptóticas ou pela inibição do sinal de transdução de diversas vias PI3K/AKT, MAPK ou NF- κB (45).

3.4. Outros fármacos indiretamente implicados

3.4.1. Inibidores do proteossoma

A degradação seletiva de proteínas por via da ubiquitina-proteossoma é um determinante crítico para a manutenção da homeostase celular. A maioria das proteínas intracelulares é degradada pelo proteossoma. Muitas das proteínas alvo do proteossoma estão envolvidas na regulação de processos de sobrevivência celular importantes da carcinogénese, tais como a progressão do ciclo celular, a proliferação celular, a diferenciação e a apoptose. Com efeito, a degradação via ubiquitina-proteossoma desempenha um papel essencial tanto na regulação da proliferação celular como na regulação da morte celular em células cancerígenas humanas. Tanto *in vitro* como *in vivo*, os resultados experimentais e clínicos demonstraram o uso potencial de inibidores de proteossoma como novos fármacos anticancerígenos (46).

Os inibidores do proteossoma têm demonstrado aumentar a suscetibilidade das células neoplásicas à apoptose *in vitro*, inibindo o crescimento do tumor, a angiogénese e as metástases *in vivo*. Estes fármacos dividem-se em três categorias: péptidos aldeídos (como MG-132, MG-115, ALLN, PSI), péptidos boronatos (como PSI-341, bortezomib) e inibidores não peptídicos (como a lactacistina) (18).

Os péptidos boronatos, tais como bortezomib, são reversíveis, mais potentes e seletivos do que os péptidos aldeídos. O bortezomib inibe reversivelmente, de forma dependente da dose, a subunidade 26S do proteossoma, que resulta na inibição de NF- κ B activo. O bortezomib mostrou efeitos anti-tumorais em diversos ensaios clínicos diferentes e é utilizado para o tratamento da recaída do MM (18, 46, 47).

Uma vez que o fenótipo de células mais frequentemente responsáveis por recaídas é o fenótipo CD34⁺, o bortezomib pode representar um fármaco ideal para a erradicação da doença residual mínima, que é o grande desafio terapêutico no tratamento da LMA. Observou-se que o efeito anti-neoplásico do bortezomib foi seletivo, já que a toxicidade nos linfócitos normais residuais foi baixa. Da mesma forma, a inibição do proteossoma provocou especificamente a apoptose em células CD34⁺/CD38⁻/CD123⁺ (células tronco hematopoiéticas de leucemia) sem toxicidade significativa para as células-tronco hematopoiéticas normais (47).

Vários outros inibidores de proteossoma também foram identificados a partir de recursos naturais, tais como metabolitos microbianos marinhos, polifenóis do chá verde e flavonoides (46, 47).

3.4.2. Inibidores das cinases dependentes de ciclinas

A importância dos complexos CDC-ciclina na proliferação celular é sublinhada pela constatação de que a desregulamentação da atividade de CDC é encontrada na maioria das neoplasias humanas. A inibição de CDC pode conduzir à paragem do ciclo celular e à apoptose (18).

O flavopiridol foi o primeiro inibidor das cinases dependentes de ciclina (ICDC) a chegar à clínica. O flavopiridol, uma flavona sintética, por inibição competitiva da ligação de ATP, inibe múltiplas proteínas CDC, o que resulta na paragem do ciclo celular ou na apoptose, dependendo do tipo de célula e da concentração do fármaco. Possíveis mecanismos anti-tumorais do flavopiridol incluem diminuição da ciclina D1, a regulação negativa de reguladores anti-apoptóticos incluindo Mcl-1, a rutura da sinalização de STAT3, a estabilização do supressor de tumor p53, e a inibição da angiogénese, principalmente através de atenuação da sinalização do *vascular endothelial growth factor* (VEGF). O flavopiridol demonstrou ser eficaz na indução da apoptose em várias neoplasias hematopoiéticas, incluindo o MM e leucemias (18).

O seliciclib (CYC202, R-roscovitina), a mais potente aminopurina análoga sintética da olomoucina, representa um outro inibidor potente de pequenas moléculas de CDC, com mecanismos moleculares de atividades anti-tumorais semelhantes às do flavopiridol. O seliciclib apresenta-se em ensaios clínicos de fase II em diversas neoplasias de células B, incluindo o MM e linfoma de células do manto (18).

3.4.3. Inibidores da desacetilação das histonas

Os HDACi são uma nova classe de fármacos capazes de alterar o estado de acetilação de histonas e proteínas não-histona. Afetam várias funções em células neoplásicas, incluindo a proliferação, a diferenciação, as respostas imunitárias, a angiogênese e a sobrevivência. Os HDACi podem induzir a apoptose e a autofagia em células neoplásicas, embora por meio de mecanismos moleculares ainda não completamente compreendidos (16, 18).

Os HDACi podem ser divididos em diversos grupos, de acordo com a sua estrutura química: os ácidos gordos de cadeia curta (como o butirato de sódio e o ácido valpróico), os hidroxamatos (como o SAHA), e os tetrapéptidos cíclicos (como a trapoxina). A sobre-regulação ou a ativação constitutiva de HDAC tem sido associada a várias neoplasias hematológicas (18).

Os HDACi exercem efeitos sinérgicos com outros fármacos citotóxicos, incluindo TRAIL, o ácido retinóico all-trans (ATRA), ou o bortezomib. Estudos preliminares indicam que os HDACi quando usados em combinação com os ITC ou inibidores JAK2 podem superar a resistência a estes últimos e potenciar os efeitos pró-apoptóticos em células de NMP. A administração de ácido valpróico em monoterapia ou em combinação com ATRA apresenta benefícios terapêuticos para doentes com NMD e leucemias. Ensaios clínicos de fase I têm demonstrado que o vorinostat tem atividade anti-tumoral em tumores sólidos e hematológicos. O depsipéptido (FK228), um HDACi natural, induziu a apoptose num número de células de LMA e LLC, especialmente quando combinado com o inibidor do proteossoma bortezomib (16, 18, 48).

O HDACi givinostat (GVS, ITF2357) demonstrou atividade anti-proliferativa e pró-apoptótica contra várias células de LMA e MM, *in vitro* e *in vivo*. O givinostat atuou também em células de NMP através da dupla JAK2 e STAT5 pela modulação de fatores de transcrição. O tratamento combinado de givinostat com hidroxiureia demonstrou ser uma estratégia potencial para induzir a apoptose em células de NMP com a mutação JAK2 V617F. A hidroxiureia é muito usada como primeira linha para a terapia mielossupressiva e combinada com este novo agente consegue aumentar a eficácia e reduzir os efeitos adversos (49, 50).

O mecanismo de ação dos HDACi, por meio da acetilação de resíduos de lisina em histonas centrais principais que conduzem a uma configuração de cromatina mais relaxada, podem melhorar o acesso ao *DNA* de um outro agente anti-neoplásico que interage diretamente com o *DNA* (como a Cisplatina), resultando numa atividade sinérgica (51).

O vorinostat (Zolinza), um HDACi, foi aprovado para o tratamento de manifestações cutâneas em doentes com linfoma cutâneo de células T, com doença progressiva, persistente ou recorrente. O vorinostat mostrou ser bem tolerado em monoterapia tal como em terapia combinada com outras terapias sistêmicas para uma série de neoplasias incluindo MM e NMD (51).

A combinação de vorinostat, com o bortezomib foi investigada em estudos de fase I em doentes pré-tratados com MM avançado recorrente ou refratário. Os dados preliminares de estudos de fase I revelaram que o vorinostat é bem tolerado quando combinado com: citarabina e etoposido para o tratamento da leucemia aguda avançada e NMD de alto risco; flavopiridol na LMA refratária ou de alto risco; lenalidomida e dexametasona em doentes com MM recorrente ou refratário; idarrubicina, em doentes com leucemia avançada; decitabina, em doentes com leucemia avançada, LMA, ou NMD; azacitidina em doentes com NMD ou LMA (51).

4. Discussão

As proteínas anti e pró-apoptóticas constituem marcadores de diagnóstico e de prognóstico, pois a maioria dos fármacos quimioterápicos, citotóxicos e imunoterápicos atuam potenciando a apoptose celular, quer pela via mitocondrial quer pelo aumento da expressão dos recetores de morte celular. Os resultados destas pesquisas são de grande importância, para o tratamento de neoplasias resultantes de um processo de apoptose excessivamente prolongado (1, 2).

Foi identificada uma grande variedade de moléculas reguladoras da apoptose, que desempenha um papel importante na regulação da morte celular em células de leucemia e linfoma. Essas moléculas representam alvos promissores para intervenção terapêutica (18).

Dentro dos alvos anti-apoptóticos da via intrínseca, são utilizados a família dos IAP e os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2. Os fármacos que atuam na família dos IAP, os miméticos Smac, as pequenas moléculas antagonistas de XIAP ou os oligonucleotídeos anti-sense de XIAP, são abordagens promissoras para atingir a XIAP, a fim de regular a apoptose em células de leucemia e linfoma (19, 20).

A expressão ou a função anormal dos IAPs pode alterar a homeostase dos compartimentos hematopoéticos e pode promover o desenvolvimento da progressão da leucemia, bem como a resistência aos fármacos. Na LMA, a sobre-expressão de XIAP pode provocar resistência à apoptose dependente das caspases. Os doentes com LMA com níveis elevados de XIAP mostram um prognóstico pior (20).

A classe dos compostos miméticos da Smac demonstrou ter um mecanismo de ação fundamental nas funções da XIAP, ao inibir a apoptose estimulada por estes compostos. As células neoplásicas ativam as caspases através de mecanismos que incluem a desregulação dos proto-oncogenes e interrupção do ciclo celular, que podem bloquear a elevada expressão dos IAPs. Espera-se que os progenitores hematopoiéticos normais tenham níveis mais baixos de caspases ativadas e, deste modo, diminuir a expressão da XIAP pode ser mais tóxico para as células neoplásicas do que para as normais. Os miméticos Smac foram menos tóxicos para as células progenitoras hematopoiéticas CD34⁺ normais do que para as células leucémicas. Esta toxicidade preferencial para as células neoplásicas está de acordo com estudos *in vivo* em ratinhos,

mostrando que estes compostos diminuem o crescimento tumoral sem serem tóxicos (20).

Estes estudos serão úteis quando doentes com LMA possam receber tratamentos que ultrapassem as resistências que ocorrem com as terapêuticas convencionais. Existem fármacos miméticos Smac em ensaios clínicos, como o LBW242, que conseguiu ultrapassar a resistência aos fármacos convencionais e à terapia com bortezomib, em doentes com MM (19, 20).

Utilizar estratégias PMI, de pequenas moléculas inibidoras, para proteínas-alvo da família Bcl-2, faz parte das classes emergentes de inibidores, atualmente em uso, em ensaios clínicos. Entre eles estão, o mimético-BH3 ABT-737, que é considerado um dos compostos mais promissores, juntamente com a sua versão oral, o ABT-263 (navitoclax) (24, 29).

Outros fármacos, cujos alvos são proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, que estão em ensaios clínicos e também são promissores, incluem o Oblimersen sódico, o gossypol (AT-101) e o obatolax (GX15-070). Estes dois últimos apresentam vantagens face aos primeiros, pois conseguem atuar num espectro mais amplo de alvos, uma vez que antagonizam, também, a proteína Mcl-1 através do bloqueio da ligação de Bak a Mcl-1, induzindo a via intrínseca da apoptose (19, 24).

Os maiores determinantes da sobrevivência das células são o equilíbrio entre membros anti e pró-apoptóticos da família Bcl-2 e a sobre-expressão de proteínas anti-apoptóticas como: Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1, que contribuem para a progressão do cancro e conferem resistência à quimioterapia e à radioterapia. A sobre-expressão de Bcl-2 está fortemente implicada na resistência à quimioterapia em doentes com LNH e os elevados níveis de Mcl-1, nos doentes com LLC, estão correlacionados com uma diminuição da resposta à quimioterapia. Por isso, a importância da descoberta de fármacos para estes alvos moleculares (28).

Em relação aos alvos anti-apoptóticos da via extrínseca, os resultados até agora obtidos demonstram que cFLIP pode induzir resistência aos ligandos dos recetores de morte e aos agentes quimioterápicos, em células de várias neoplasias. Portanto, cFLIP pode ser um alvo terapêutico relevante para contrariar neoplasias humanas resistentes à terapêutica. Para reduzir ou inibir a expressão da cFLIP são necessárias moléculas pequenas que têm como alvo a cFLIP, sem inibir as caspases-8 e 10, para que não haja inibição da apoptose (26).

Dentro dos alvos pró-apoptóticos da via intrínseca, foram estudados membros da família Bcl-2, contudo, os mecanismos pelos quais as proteínas BH3, Bax, Bak e membros pró-sobrevivência da família Bcl-2 interagem para mediar a vida e a morte da célula, ainda não são totalmente conhecidos. Deste modo, a discussão limita-se ao modelo mais provável para a interação entre os anti e pró-apoptóticos da família Bcl-2 (29).

Alguns antagonistas de Bcl-2, como o ABT-737, são altamente específicos para uma subclasse de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL e Bcl-w) mas não para outra (Mcl-1). Contudo, a indução da apoptose requer o antagonismo de ambas as subclasses de proteínas anti-apoptóticas. Está descrito o desenvolvimento do mimético da hélice α BH3-M6 que desfaz as interações entre Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1 com Bax, Bak e Bim e conduz à libertação do citocromo c, à ativação das caspases, à quebra da PARP e à apoptose em células cancerígenas humanas. Isto induz a mudança de conformação de Bax e requer a expressão de Bax e a ativação de caspases para induzir a apoptose. O BH3-M6 desfaz essas interações pela ligação de BH3, mostrando-se capaz de antagonizar as duas subclasses distintas, o que é importante para a indução da apoptose. O fármaco BH3-M6 ao interromper a ligação de Bim com proteínas anti-apoptóticas, liberta-a e induz a apoptose pela ativação de Bax e Bak. Como estas proteínas pró-apoptóticas Bax, Bak e Bim podem ser degradadas pelo proteossoma, a combinação do fármaco BH3-M6 com um inibidor do proteossoma parece ser mais eficaz para o tratamento (28).

Os alvos pró-apoptóticos da via extrínseca abordados incluem os recetores de morte da família do FNT, nomeadamente, o FNT- α , o FasL e o TRAIL. A expressão aumentada do FasL em leucemias, constitui um dos mecanismos de escape dos clones neoplásicos à resposta imunitária anti-tumoral e à ação de fármacos quimioterápicos (2).

Há estudos que sugerem que a resistência adquirida a TRAIL pode envolver mecanismos reguladores comuns, incluindo outros membros da família de recetores do FNT. Como consequência, a resistência adquirida a TRAIL pode ser associada com resistência a outros membros da família de ligandos de morte, FNT- α e FasL, sugerindo um aumento da capacidade das células neoplásicas para escapar à vigilância imunitária do tumor e às respostas imunes anti-tumorais (32).

Os alvos das vias apoptóticas intrínseca e extrínseca, são relevantes para o desenvolvimento de um arsenal terapêutico, baseado no TRAIL, para o tratamento de

leucemias e outras neoplasias hematopoiéticas. Uma vez que a resistência primária ao TRAIL, provavelmente, vai limitar o sucesso do seu uso na clínica, têm havido muitos esforços, ao longo dos últimos anos, para o desenvolvimento de regimes de combinação de fármacos com o objetivo de ultrapassar os mecanismos de resistência (19, 32).

A grande maioria de células tumorais primárias de neoplasias hematopoiéticas é, geralmente, resistente à apoptose mediada por TRAIL. Os mecanismos de resistência são multifatoriais e envolvem: expressão deficiente dos recetores TRAIL-R1/TRAIL-R2, níveis elevados de recetores “decoy”, expressão aumentada de inibidores como a c-FLIP, níveis aumentados de proteínas anti-apoptóticas como a XIAP ou Bcl-2 ou outros mecanismos desconhecidos (33).

Vários tipos de terapias combinadas aumentam, consideravelmente, a apoptose mediada por TRAIL. O TRAIL atua na via extrínseca da apoptose enquanto a quimioterapia e a radioterapia inibem, sobretudo, o crescimento celular e ativam a via intrínseca. A combinação de ambas as terapias consegue ativar estas duas vias e assim aumentar os efeitos. O efeito sinérgico entre os dois tratamentos resulta da expressão aumentada de TRAIL-R1 e TRAIL-R2 induzida pela quimioterapia ou radioterapia, pela interação entre as vias extrínseca e intrínseca mediada pela caspase 8, induzida pela ativação da Bid (tBid). Para além disso os tratamentos combinados envolvendo outros fármacos como inibidores do proteossoma, inibidores do NF- κ B e HDACi, conseguem ultrapassar a resistência das terapias por agentes isolados (33).

Outros alvos regulatórios da apoptose baseiam-se, sobretudo, em vias de sobrevivência das neoplasias, nestes incluem-se as HSP e as várias vias dependentes da TC (PI3K/AKT/mTOR, cascata JAK-STAT, RTC, MAPK, BCR-ABL e PCK, entre outras).

Os chaperones moleculares, envolvidos em vias de sinalização como as HSP, desempenham papéis fundamentais na fisiopatologia da maioria das neoplasias hematológicas, mielóides e linfóides. Estão em ensaios clínicos fármacos que são inibidores de HSP90 (como o 17-AAG, CNF-2024 e PU-H71). Existem estudos que apresentam as HSP70 como biomarcador da atividade de outros fármacos como a lenalidonmida, um imunomodulador e de agentes desmetilantes usados no tratamento de NMD, tais como azacitidina e decitabina. O oligonucleótido anti-sense OGX-427 é um inibidor específico de HSP27 que está também em ensaios clínicos e tem mostrado segurança (34).

Os inibidores duplos PI3K/mTOR podem representar uma opção promissora para futuras terapias-alvo, em doentes com leucemia aguda. Os resultados obtidos até agora indicam que a terapia multialvo para PI3K e mTOR pode ser eficaz, para doentes com leucemias, que apresentem regulação positiva da sinalização PI3K/AKT/mTOR. O PI-103, um inibidor PI3K/mTOR, apesar de afetar a formação de clones de progenitores leucémicos, não induziu apoptose em células CD34⁺ de doadores saudáveis e teve efeitos moderados nas suas propriedades proliferativas. Isto sugere a possível existência de uma janela terapêutica *in vivo*, se forem usados inibidores PI3K/mTOR para tratar doentes com leucemia. O PI-103 obteve eficácia em células de LLA-B Ph⁺ e em estudos pré-clínicos de LLA-T. Para além disso, o PI-103 em sinergia com As₂O₃ obteve resultados muito encorajadores, que indicam que a terapia com As₂O₃ pode ser explorada como uma nova estratégia para o direcionamento de doentes não-LPA, em combinação com inibidores da dupla PI3K/mTOR (38).

A cascata JAK-STAT é fundamental para o funcionamento normal da hematopoiese. Alguns estudos demonstraram que esta via de sobrevivência STAT3 está frequentemente ativa no MM. A STAT3 pode, assim, ser um novo alvo para neoplasias hematopoiéticas, incluindo o MM. Estes trabalhos sugerem que a cladribina, em combinação com inibidores da STAT3, pode ser mais promissora para os doentes, exercendo um potencial terapêutico mais amplo no MM (39).

O potencial dos ITC, nomeadamente o imatinib, na LMC, BCR-ABL positiva, pode ser transposto com sucesso para neoplasias mielóides com eosinofilia associada a genes de fusão mas não para a mastocitose sistémica. Duas alternativas ao imatinib, o dasatinib e o nilotinib têm sido estudadas, sendo este último um ITC com um perfil semelhante, é capaz de superar a resistência na LMC resistente ou intolerante ao imatinib. Tendo em conta as diferentes moléculas alvo das vias TC dependentes, têm surgido novos fármacos capazes de inibir simultaneamente diversas vias, como por exemplo o sorafenib (Nexavar) (41).

A PCK-delta, uma isoforma de PCK independente do Ca²⁺, exerce a sua ação ao aumentar a apoptose. Trata-se de um alvo terapêutico da briostatina-1 e do seu análogo aplog-1, com potencial para terapêutica de leucemias refratárias e neoplasias hematopoiéticas indolentes (44).

A inibição do proteossoma nas células cancerígenas conduz à acumulação de proteínas alvo pró-apoptóticas, seguida pela indução de morte celular. A eficácia clínica do bortezomib no MM e noutras neoplasias hematológicas fornece a indicação que o

proteossoma é alvo de uma estratégia promissora para o tratamento de neoplasias (46, 47).

Um papel futuro do ácido valpróico para o tratamento de NMP, incluindo a LMA, também é suportado por observações recentes, sugerindo que este agente possa ser útil em NMP crônicas. Assim, os HDACi devem fazer parte do tratamento da LMA, pelo menos para doentes idosos ou sem indicação para a quimioterapia intensiva. Isto baseia-se nos resultados disponíveis a partir de vários estudos clínicos, que mostram que o ácido valpróico é o HDACi mais extensivamente investigado em LMA humana. Este tratamento pode induzir uma melhoria clinicamente significativa na contagem de células de sangue periférico e na estabilização do estado clínico, para doentes com LMA, e o risco de toxicidade clinicamente relevante é mínimo (48).

O uso de inibidores de recetores de morte pode fazer sentido quando esses recetores estão envolvidos na morte celular excessiva, ou na inativação de vias de sobrevivência. A maior parte dos fármacos que visam vias apoptóticas, introduzidos na clínica, têm demonstrado tolerabilidade. A sua eficácia, isoladamente ou em combinação com outros fármacos, tais como inibidores da desacetilação das histonas é, atualmente, testada em doenças hematológicas mielóides e linfóides (52).

5. Conclusões e perspectivas futuras

A importância da apoptose nas neoplasias hematopoiéticas é evidente, pelo seu papel regulador da homeostase nas células normais e no desequilíbrio demonstrado entre morte e proliferação celular, em células neoplásicas.

Através do estudo de uma série de vias de sobrevivência ativadas e de vias apoptóticas, intrínsecas e extrínsecas, observou-se que a sua desregulação contribui para a gênese das neoplasias hematopoiéticas e, em muitos casos, para a resistência à terapêutica.

A *Classificação da OMS dos tumores do tecido hematopoiético e linfóide*, de 2008, trazendo novo paradigma e novos critérios, sobretudo através da introdução da informação genética no diagnóstico das neoplasias hematopoiéticas, permitiu novos métodos de trabalho e novas perspectivas de alvos moleculares para a terapêutica.

Os tratamentos farmacológicos cada vez mais personalizados pela especificidade do diagnóstico, bem como pelo aumento do número de possíveis combinações de fármacos, têm o intuito de aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade. O efeito sinérgico da combinação de agentes anti-tumorais, que atuam em diferentes vias apoptóticas, pode ter máxima eficácia terapêutica em neoplasias hematopoiéticas.

A regulação da apoptose precisa de ser mais bem elucidada. É preciso saber como pode ser reparada por meio de terapia genética específica; como pode ser desencadeada, seletivamente, por tratamentos dirigidos para induzir apoptose de células cancerígenas, enquanto as residuais normais permaneçam intactas; como funcionam as moléculas ativadoras de caspases; como as caspases iniciam as alterações de membrana que resultam em remoção de células apoptóticas por fagocitose e, por último, onde está o ponto de retorno, após o qual a apoptose uma vez desencadeada não pode mais ser revertida (3).

A investigação continua, também, com o objetivo de se encontrarem compostos capazes de induzir ou inibir a formação do apoptossoma (1, 2)

Apesar de serem muito ativos na leucemia, os miméticos Smac tem efeitos pouco revelantes sobre células progenitoras hematopoiéticas normais, sugerindo um potencial terapêutico promissor, como nova classe de fármacos anticancerígenos, em onco-hematologia, particularmente quando combinados com TRAIL, para vencer a resistência das células cancerígenas (19, 20).

Vários miméticos-BH3 foram submetidos a análise, em ensaios clínicos. Há que investir na melhoria das propriedades farmacológicas, otimização de fórmulas e redução da toxicidade, para maior aplicação em terapias anticancerígenas. Tendo em vista o enorme progresso relativamente ao desenvolvimento de tais inibidores, essa abordagem inovadora é promissora e tem potencial para se tornar, no futuro, alvo potencial para terapia do cancro (24, 29).

É necessário conhecer melhor a forma como as proteínas BH3 são essenciais para a indução de apoptose, por agentes quimioterapêuticos, individualmente ou combinados (29).

Dado que as células neoplásicas expressam HSP70 na membrana plasmática, ao contrário das normais, seria interessante utilizar péptidos aptâmeros carregados com nanopartículas, revestidas externamente com anticorpos que visam especificamente as células neoplásicas. Isso poderia abrir novas perspectivas para a terapia personalizada usando-os como agentes de quimio-sensibilização em doenças humanas com sobre-expressão de HSP70. As HSP representam um alvo potencial e muito eficaz no tratamento de neoplasias hematológicas (34).

Vários estudos sobre HDACi mostraram que as estratégias epigenéticas usadas, na LMA, são consideradas promissoras. Novas terapias alvo devem ser procuradas, particularmente no tratamento de doentes idosos com LMA e as estratégias epigenéticas mostraram ser alternativas bem toleradas. Um aumento das taxas de resposta pode ser esperado pela combinação de terapias de baixa toxicidade (48).

6. Bibliografia

1. Marek L. The role of the apoptosome in the activation of procaspase-9. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej* (Online). 2013;67:54.
2. Bergantini APF, Castro FA, Souza AM, Fett-Conte AC. Leucemia mielóide crônica eo sistema Fas-FasL. *Rev bras hematol hemoter*. 2005;27(2):120-5.
3. Kerr J, Wyllie A, Curie A. A propósito da apoptose em LMC: estudos promissores. *Rev bras hematol hemoter*. 2005;27(2):79-82.
4. Yuan CH, Filippova M, Duerksen-Hughes P. Modulation of apoptotic pathways by human papillomaviruses (HPV): mechanisms and implications for therapy. *Viruses*. 2012 Dec;4(12):3831-50.
5. Dunkle A, He Y-W. Apoptosis and autophagy in the regulation of T lymphocyte function. *Immunologic research*. 2011;49(1-3):70-86.
6. Cullen S, Brunet M, Martin S. Granzymes in cancer and immunity. *Cell Death & Differentiation*. 2010;17(4):616-23.
7. Ulukaya E, Acilan C, Ari F, Ikitimur E, Yilmaz Y. A Glance at the methods for detection of apoptosis qualitatively and quantitatively. *Türk Biyokimya Dergisi* [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem]. 2011;36(3):261-9.
8. Weldetsadik AT. Clinical characteristics of patients with hematological malignancies at gondar university hospital, North West Ethiopia. *Ethiopian medical journal*. 2013 Jan;51(1):25-31.
9. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Patologia Básica*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1994.
10. Lorenzi TF. *Manual de hematologia: propedêutica e clínica*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.
11. Hoffbrand AV, Lewis SM, Tuddenham EGD. *Postgraduate haematology*. 4 ed. Oxford: Butterworth Heineman; 1999.
12. Silva GC, Pilger DA, de Castro SM, Wagner SC. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. *J Bras Patol Med Lab*. 2006;42(2):77-84.
13. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 Jul 30;114(5):937-51.

14. Vardiman JW. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: An overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chemico-biological interactions*. 2010 3/19/;184(1–2):16-20.
15. Cazzola M, Malcovati L, Invernizzi R. Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Hematology/the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2011;2011:264.
16. Mithraprabhu S, Grigoriadis G, Khong T, Spencer A. Deactylase inhibition in myeloproliferative neoplasms. *Invest New Drugs*. 2010 Dec;28 Suppl 1:S50-7.
17. Jonge HJ, Huls G, de Bont ES. Gene expression profiling in acute myeloid leukaemia. *The Netherlands journal of medicine*. 2011 Apr;69(4):167-76.
18. Zivny J, Klener P, Jr., Pytlik R, Andera L. The role of apoptosis in cancer development and treatment: focusing on the development and treatment of hematologic malignancies. *Current pharmaceutical design*. 2010 Jan;16(1):11-33.
19. Fulda S. Cell death in hematological tumors. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*. 2009;14(4):409.
20. Servida F, Lecis D, Scavullo C, Drago C, Seneci P, Carlo-Stella C, et al. Novel second mitochondria-derived activator of caspases (Smac) mimetic compounds sensitize human leukemic cell lines to conventional chemotherapeutic drug-induced and death receptor-mediated apoptosis. *Invest New Drugs*. 2011 Dec;29(6):1264-75.
21. Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009 Feb 15;15(4):1126-32.
22. Fu Q, He C, Mao ZR. Epstein-Barr virus interactions with the Bcl-2 protein family and apoptosis in human tumor cells. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2013 Jan;14(1):8-24. PubMed PMID: 23303627.
23. Tzifi F, Economopoulou C, Gourgiotis D, Ardavanis A, Papageorgiou S, Scorilas A. The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias. *Advances in Hematology*. 2012;2012.
24. Azmi AS, Wang Z, Philip PA, Mohammad RM, Sarkar FH. Emerging Bcl-2 inhibitors for the treatment of cancer. *Expert opinion on emerging drugs*. 2011 Mar;16(1):59-70.
25. Bajwa N, Liao C, Nikolovska-Coleska Z. Inhibitors of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents*. 2012 Jan;22(1):37-55. PubMed PMID: 22195752.

26. Safa AR. c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator. *Exp Oncol*. 2012 Oct;34(3):176-84.
27. Gavathiotis E, Suzuki M, Davis ML, Pitter K, Bird GH, Katz SG, et al. BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature*. 2008;455(7216):1076-81.
28. Kazi A, Sun J, Doi K, Sung SS, Takahashi Y, Yin H, et al. The BH3 alpha-helical mimic BH3-M6 disrupts Bcl-X(L), Bcl-2, and MCL-1 protein-protein interactions with Bax, Bak, Bad, or Bim and induces apoptosis in a Bax- and Bim-dependent manner. *The Journal of biological chemistry*. 2011 Mar 18;286(11):9382-92.
29. Kuroda J, Taniwaki M. Involvement of BH3-only proteins in hematologic malignancies. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2009 Aug;71(2):89-101.
30. Tsubaki M, Itoh T, Satou T, Imano M, Komai M, Ogawa N, et al. Nitrogen-containing bisphosphonates induce apoptosis of hematopoietic tumor cells via inhibition of Ras signaling pathways and Bim-mediated activation of the intrinsic apoptotic pathway. *Biochemical pharmacology*. 2013 Jan 15;85(2):163-72.
31. Senderowicz AM. Targeting cell cycle and apoptosis for the treatment of human malignancies. *Current opinion in cell biology*. 2004 Dec;16(6):670-8.
32. Klener P, Jr., Leahomski S, Molinsky J, Simonova T, Necas E, Gasova Z, et al. TRAIL-induced apoptosis of HL60 leukemia cells: two distinct phenotypes of acquired TRAIL resistance that are accompanied with resistance to TNFalpha but not to idarubicin and cytarabine. *Blood cells, molecules & diseases*. 2009 Jan-Feb;42(1):77-84.
33. Testa U. TRAIL/TRAIL-R in hematologic malignancies. *Journal of cellular biochemistry*. 2010 May;110(1):21-34.
34. Mjahed H, Girodon F, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins in hematopoietic malignancies. *Experimental cell research*. 2012 Sep 10;318(15):1946-58.
35. Al-Ameri A, Cherry M, Garcia-Manero G, Quintas-Cardama A. Standard therapy for patients with myelodysplastic syndromes. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. 2011 Aug;11(4):303-13.
36. Polivka J, Jr., Janku F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacology & therapeutics*. 2013 Dec 9.
37. Kelly KR, Rowe JH, Padmanabhan S, Nawrocki ST, Carew JS. Mammalian target of rapamycin as a target in hematological malignancies. *Targeted oncology*. 2011 Mar;6(1):53-61.

38. Martelli AM, Chiarini F, Evangelisti C, Cappellini A, Buontempo F, Bressanin D, et al. Two hits are better than one: targeting both phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin as a therapeutic strategy for acute leukemia treatment. *Oncotarget*. 2012 Apr;3(4):371-94.
39. Ma J, Wang S, Zhao M, Deng XS, Lee CK, Yu XD, et al. Therapeutic potential of cladribine in combination with STAT3 inhibitor against multiple myeloma. *BMC cancer*. 2011;11:255.
40. Quintas-Cardama A. The role of Janus kinase 2 (JAK2) in myeloproliferative neoplasms: therapeutic implications. *Leukemia research*. 2013 Apr;37(4):465-72.
41. Ustun C, DeRemer DL, Akin C. Tyrosine kinase inhibitors in the treatment of systemic mastocytosis. *Leukemia research*. 2011 Sep;35(9):1143-52.
42. Huber S, Oelsner M, Decker T, zum Buschenfelde CM, Wagner M, Lutzny G, et al. Sorafenib induces cell death in chronic lymphocytic leukemia by translational downregulation of Mcl-1. *Leukemia*. 2011 May;25(5):838-47.
43. Zauli G, Voltan R, Tisato V, Secchiero P. State of the art of the therapeutic perspective of sorafenib against hematological malignancies. *Current medicinal chemistry*. 2012;19(28):4875-84.
44. Irie K, Yanagita RC, Nakagawa Y. Challenges to the development of bryostatin-type anticancer drugs based on the activation mechanism of protein kinase Cdelta. *Medicinal research reviews*. 2012 May;32(3):518-35.
45. Singh N, Nigam M, Ranjan V, Sharma R, Balapure AK, Rath SK. Caspase mediated enhanced apoptotic action of cyclophosphamide- and resveratrol-treated MCF-7 cells. *Journal of pharmacological sciences*. 2009 Apr;109(4):473-85.
46. Frezza M, Schmitt S, Dou QP. Targeting the ubiquitin-proteasome pathway: an emerging concept in cancer therapy. *Current topics in medicinal chemistry*. 2011 Dec;11(23):2888-905.
47. Colado E, Alvarez-Fernandez S, Maiso P, Martin-Sanchez J, Vidriales MB, Garayoa M, et al. The effect of the proteasome inhibitor bortezomib on acute myeloid leukemia cells and drug resistance associated with the CD34+ immature phenotype. *Haematologica*. 2008 Jan;93(1):57-66.
48. Fredly H, Gjertsen BT, Bruserud O. Histone deacetylase inhibition in the treatment of acute myeloid leukemia: the effects of valproic acid on leukemic cells, and the clinical and experimental evidence for combining valproic acid with other antileukemic agents. *Clinical epigenetics*. 2013;5(1):12.

49. Amaru Calzada A, Pedrini O, Finazzi G, Leoni F, Mascagni P, Introna M, et al. Givinostat and hydroxyurea synergize in vitro to induce apoptosis of cells from JAK2(V617F) myeloproliferative neoplasm patients. *Experimental hematology*. 2013 Mar;41(3):253-60 e2.
50. Amaru Calzada A, Todoerti K, Donadoni L, Pellicoli A, Tuana G, Gatta R, et al. The HDAC inhibitor Givinostat modulates the hematopoietic transcription factors NFE2 and C-MYB in JAK2(V617F) myeloproliferative neoplasm cells. *Experimental hematology*. 2012 Aug;40(8):634-45 e10.
51. Siegel D, Hussein M, Belani C, Robert F, Galanis E, Richon VM, et al. Vorinostat in solid and hematologic malignancies. *Journal of hematology & oncology*. 2009;2:31.
52. Droin N, Guery L, Benikhlef N, Solary E. Targeting apoptosis proteins in hematological malignancies. *Cancer letters*. 2013 May 28;332(2):325-34.